



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**STUDIUM REAKTIVITY BAKTERIÁLNÍCH
EXTRACELULÁRNÍCH POLYSACHARIDŮ**

STUDY ON THE REACTIVITY OF EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDES PRODUCED BY BACTERIA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Barbora Vacková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Michal Kalina, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1466/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Barbora Vacková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **Ing. Michal Kalina, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Studium reaktivity bakteriálních extracelulárních polysacharidů

Zadání bakalářské práce:

- 1) Definovat metodiky využitelné pro studium reaktivity polysacharidů.
- 2) Navrhnout a optimalizovat metodiky studia interakcí bakteriálního extracelulárního polysacharidu (fucopol) s kovy.
- 3) Optimalizace transportních experimentů pro účely posouzení interakce kovů s fucopolem.
- 4) Zhodnocení experimentálních dat a formulace závěrů.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Barbora Vacková
student(ka)

Ing. Michal Kalina, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá studiem reaktivity bakteriálních extracelulárních polysacharidů. V praktické části pojednává o extracelulárním polysacharidu FucoPol. Kvůli přítomnosti acylových skupin má polymer aniontový charakter a může podporovat interakce s jinými kladně nabitými látkami. V rámci bakalářské práce byly studovány interakce FucoPolu s kovy. Pro měření byl využíván zejména izotermický titrační kalorimetr a byly provedeny sorpční experimenty. Hlavním cílem byla optimalizace podmínek procesů měření a posouzení interakcí mezi kovy a FucoPolem. Pomocí titrační kalorimetrie a sorpčních experimentů byla potvrzena vazba kationtu kovu na matici FucoPolu. Míra interakce se lišila v závislosti na použitém kovu, zejména Co^{2+} , Pb^{2+} a Zn^{2+} ionty se vázaly velice slabě, a naopak ionty Cu^{2+} a Fe^{3+} měly velkou afinitu ke studovanému biopolymeru.

FucoPol jakožto biodegradabilní biopolymer by se mohl v budoucnu stát jedním z důležitých průmyslově vyráběných polysacharidů, který by se dále mohl využívat v obalových materiálech, zejména pro jeho interakci s kovy, dále v zemědělství jako biohnojivo anebo také v lékařství s potenciálem pro použití v protinádorových, protizánětlivých a imunitně posilujících léčivech.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the reactivity of bacterial extracellular polysaccharides. The experimental part deals with extracellular polysaccharide FucoPol. Due to the presence of acyl groups, the polymer has an anionic character and can promote interactions with other positively charged substances. In this bachelor thesis interactions of FucoPol with metals were studied. For measuring, an isothermal titration calorimeter was used, and sorption experiments were performed. The main objective of the work was optimization of conditions for measuring interactions between metals and FucoPol. Connection of metal cations to FucoPol matrix were confirmed by titration calorimetry and sorption experiments. The interaction rate was different depending on the metal which was used. Co^{2+} , Pb^{2+} a Zn^{2+} ions showed very weak binding, otherwise Cu^{2+} a Fe^{3+} ions had high affinity for the studied biopolymer.

FucoPol, as a biodegradable biopolymer, can be in the future one of important industrially produced polysaccharides. It could be used for packaging, biofuel production and production of anti-inflammatory and immune-boosting drugs.

KLÍČOVÁ SLOVA

bakterie, exopolysacharid, FucoPol, kovy, reaktivita

KEY WORDS

bacteria, exopolysaccharide, FucoPol, metals, reactivity

VACKOVÁ, Barbora. *Studium reaktivity bakteriálních extracelulárních polysacharidů*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113691>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Ing. Michal Kalina, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
Barbora Vacková

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Michalu Kalinovi, Ph.D. za celkové vedení, vstřícnost při konzultacích a pomoc při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat také Ing. Jitce Krouské, Ph.D. za pomoc při práci v laboratoři.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1. Bakteriální polysacharidy	8
2.2. Bakteriální tvorba polysacharidů	9
2.3. Fukózové polysacharidy – FucoPol	12
2.3.1. Produkce a purifikace FucoPolu	12
2.3.2. Využití FucoPolu	13
2.4. Metody charakterizace exopolysacharidů	14
2.4.1. Kolorimetrická metoda (metoda fenol-kyselina sírová)	15
2.4.2. Gelová permeační chromatografie (GPC)	16
2.4.3. Hydrodynamická chromatografie (HDC)	17
2.4.4. Vysokoúčinná aniontová chromatografie (HPAEC)	17
2.4.5. Nukleární magnetická rezonanční spektrometrie (NMR)	17
2.4.6. Plynová chromatografie – hmotnostní spektrometrie (GC/MS)	18
2.4.7. Spektroskopické metody charakterizace	18
2.4.8. Termo-analytické metody charakterizace	19
2.4.9. Charakterizace mechanických vlastností a další metody charakterizace	20
3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	22
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
4.1. Použité chemikálie	25
4.2. Použité přístroje	25
4.3. Charakterizace FucoPolu	25
4.3.1. Elementární analýza a termogravimetrie	25
4.3.2. Určení molekulové hmotnosti	26
4.4. Studium interakce kovů s FucoPolem pomocí ITC	26
4.4.1. Příprava zásobních roztoků pro měření ITC	27
4.5. Studium interakce kovů s FucoPolem pomocí sorpčních experimentů	27
4.5.1. Příprava zásobních roztoků a gelů pro měření sorpčních experimentů	28
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	29
5.1. Charakterizace FucoPolu	29
5.1.1. Elementární a termogravimetrická analýza	29
5.1.2. Určení molekulové hmotnosti	29

5.2.	Studium interakce kovů s FucoPolem pomocí ITC	30
5.3.	Studium interakce kovů s FucoPolem pomocí sorpčních experimentů.....	33
5.3.1.	Kalibrační křivky	33
5.3.2.	Sorpční experimenty	34
5.3.3.	Desorpce	37
5.3.4.	Vliv aniontu	38
6.	ZÁVĚR	41
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	42
8.	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	46
8.1.	Použité symboly	46
8.2.	Použité zkratky	46

1. ÚVOD

Polysacharidy jsou široce používány hlavně v průmyslových odvětvích, jako je farmaceutický, kosmetický, potravinářský a chemický průmysl. Tyto materiály jsou velice zajímavé kvůli jejich fyzikálním a strukturním vlastnostem, jelikož mohou být použity jako emulgátory, pojidla, stabilizátory, zahušťovací nebo vložkovací činidla, koagulanty atd. Velkou výhodou biopolymerů získávaných z přírodních zdrojů je to, že nejsou pro životní prostředí toxické a jsou biologicky odbouratelné na rozdíl od syntetických polymerů. Některé bakterie mají schopnost syntetizovat biopolymery, které tak představují nejvýhodnější způsob získávání polysacharidů, jelikož výrobní podmínky lze snadno optimalizovat, což zvyšuje produktivitu a umožňuje určovat vlastnosti polymeru.

V závislosti na jejich biologické funkci mají bakteriální polysacharidy různé umístění v buňce. Mohou být buď intracelulární, spojené s ukládáním živin (např. glykogen), extracelulární (např. xanthan) nebo také součást buněčné stěny (např. peptidoglykan), které poskytují ochranu buňky. Extracelulární polysacharidy neboli exopolysacharidy (EPS) se nacházejí mimo buněčnou stěnu. Tvoří buď bakteriální kapsli (kovalentně vázanou na buněčnou membránu) nebo jsou přítomné jako sliz, který je volně vázán na buněčný povrch.

EPS jsou důležitými zdroji pro hydrokoloidy používané v potravinářském, farmaceutickém a chemickém průmyslu. Vzhledem k mnoha zajímavým fyzikálně-chemickým a reologickým vlastnostem fungují mikrobiální EPS jako nové biomateriály a nacházejí uplatnění v široké škále aplikací v mnoha průmyslových odvětvích, jako jsou textilie, detergenty, lepidla, čištění odpadních vod, kosmetologie, farmakologie a potravinářské přídatné látky.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Bakteriální polysacharidy

Během posledních dvou desetiletí došlo ke zvyšování zájmu o polysacharidy produkované extracelulárně bakteriemi, které se využívají v chemickém, potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Široký rozsah jejich využitelnosti souvisí s velkou rozmanitostí strukturních a funkčních vlastností.

Bakteriální polysacharidy jsou ve vodě rozpustné biopolymery produkované mnoha druhy bakterií. Vzhledem k jejich reologickým charakteristikám se bakteriální polysacharidy používají jako pojidla, koagulanty, emulgátory, filmotvorné látky, gelující činidla, mazadla, stabilizátory a zahušťovací činidla [1].

Polysacharidy, které jsou produkovány bakteriemi a jsou vylučovány na jejich povrchu, se označují jako extracelulární polysacharidy neboli exopolysacharidy (EPS). Ty existují buď kovalentně vázané na buněčný povrch ve formě kapsle nebo volně vázané na povrch buňky ve formě slizu. Předpokládá se, že jejich funkce je hlavně ochranná a brání tak přístupu škodlivých látek do organismu [2].

Extracelulární polysacharidy vykazují značnou rozmanitost ve složení a struktuře. Jsou obecně klasifikovány jako homopolysacharidy a heteropolysacharidy na základě jejich monomerního složení. Homopolysacharidy jsou složeny z jednoho typu monosacharidové jednotky, kde jsou navázány monomery cukru tvořící buď lineární řetězce (levan, kurdlan nebo bakteriální celulóza) nebo rozvětvené řetězce (dextran). Heteropolysacharidy se skládají ze dvou nebo více typů monosacharidů.

Mikroorganismy, které se používají jako průmysloví nebo techničtí producenti EPS jsou především bakterie. Druhy *Xanthomonas*, *Leuconostoc*, *Sphingomonas* a *Alcaligenes* které produkují xanthan, dextran, gellan a kurdlan jsou nejznámější a nejvíce průmyslově využívány. Tabulka 1 shrnuje bakteriální druhy a jejich odpovídající polysacharidy, které mají potenciál pro komerční využití [3].

Tabulka 1: Hlavní bakteriální polysacharidy [2, 3]

EPS	Monomery	Náboj	Bakterie
Alginát	Kyselina guluronová Kyselina mannuronová	Záporný	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Azotobacter vinelandii</i>
Celulóza	Glukóza	Žádný	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>
Kurdlan	Glukóza	Žádný	<i>Alcaligenes faecalis</i>
Dextran	Glukóza	Žádný	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Gellan	Glukóza Rhamnóza Kyselina glukuronová	Záporný	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> <i>Sphingomonas elodea</i>
Hyaluronan	Kyselina glukuronová Acetylglukosamin	Záporný	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pasteurella multocida</i>
Levan	Fruktóza	Žádný	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Zymomonas mobilis</i> <i>Halomonas eurihalina</i>
Xanthan	Glukóza Manóza Kyselina glukuronová	Záporný	<i>Xanthomonas campestris</i>

2.2. Bakteriální tvorba polysacharidů

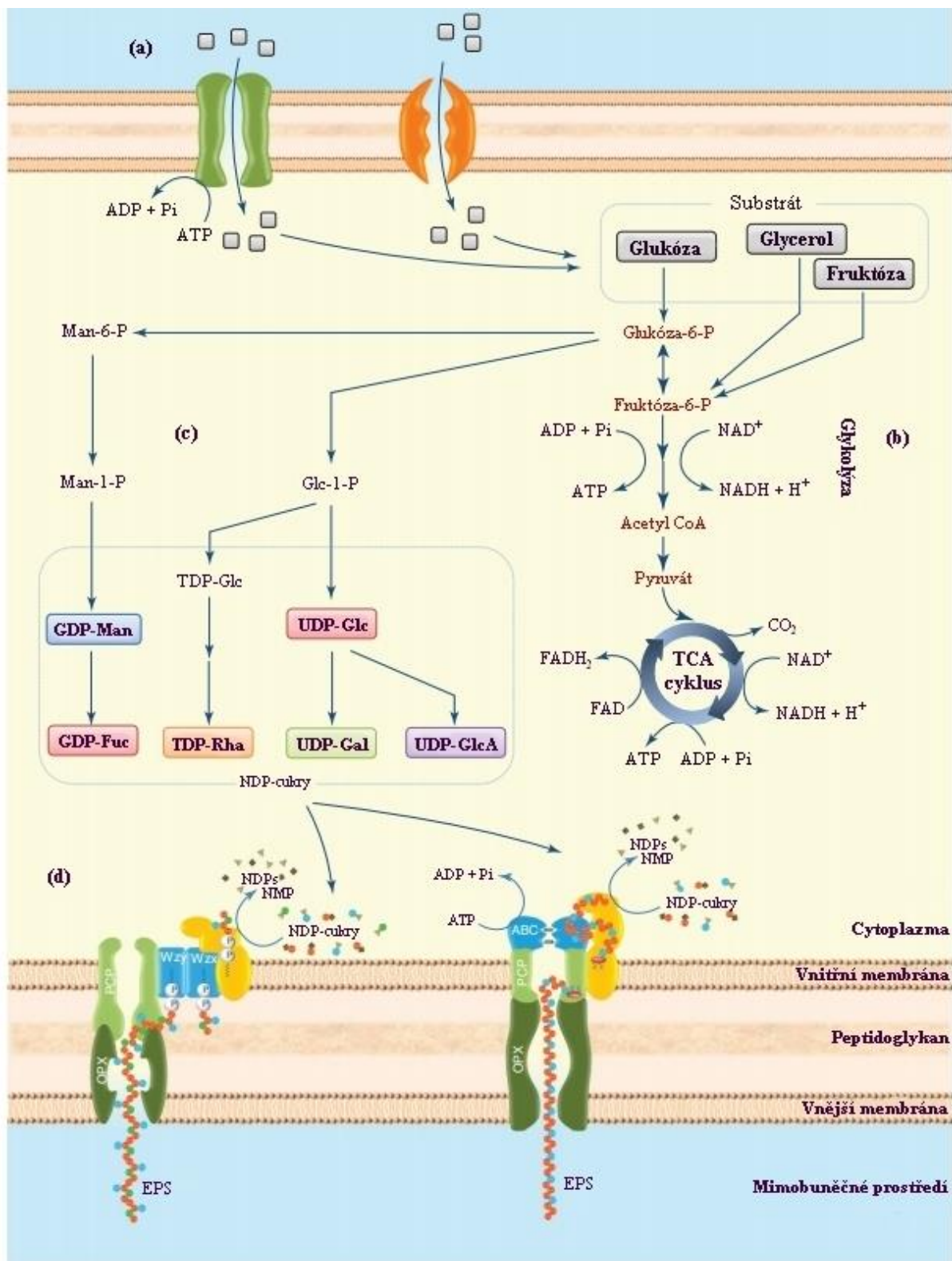
Exopolysacharidy mají různé fyziologické vlastnosti v závislosti na mikroorganismu a okolních podmínkách. Funkce EPS souvisí zejména s ochrannými mechanismy, protože mohou zabránit buněčnému vysychání kvůli své schopnosti zadržovat vodu a mohou také chránit buňku před nepřátelskými mikroorganismy. Tyto biopolymery působí jako strukturní prvky při tvorbě biofilmů a také jsou velice důležité pro přilnavost k různým povrchům. Jsou významné pro interakce s jinými mikroorganismy, např. v procesech rozpoznávání a shlukování s dalšími bakteriálními buňkami [4].

Tyto biopolymery lze syntetizovat dvěma různými mechanismy v závislosti na bakteriích, které je produkují. Většina bakteriálních EPS, pocházejících z gramnegativních bakterií, se syntetizuje intracelulárně a exportují se do extracelulárního prostředí jako makromolekuly (např. xanthan, gellan, celulóza). Existuje několik výjimek (např. levan a dextran), což jsou EPS pocházející z grampozitivních bakterií, jejichž syntéza a polymerace nastává mimo buňku, a to působením vylučovaných enzymů, které převádějí substrát na polymer v extracelulárním prostředí. Bakteriální biosyntetické dráhy zahrnují absorpci substrátu, centrální metabolické dráhy a syntézu polysacharidů (Obrázek 1).

U gramnegativních bakterií lze celý proces rozdělit do 4 kroků, které jsou zprostředkovány různými enzymy. Biosyntéza EPS začíná transportem cukru do cytoplazmy bakterií. Většina molekul cukru, které vstoupily do cytoplazmy bakterií, se fosforyluje na cukr-6-fosfáty (např. glukóza-6-fosfát) a následně degraduje glykolýzou. Několik cukr-6-fosfátů se přemění pomocí fosfoglukomutázy na cukr-1-fosfáty (např. glukóza-1-fosfát). Třetím krokem je syntéza cukrových nukleotidů. Cukr-1-fosfáty, produkované v cytoplazmě bakterií, jsou důležitými meziprodukty při výrobě cukrových nukleotidů, jako je uridindifosfát glukóza (UDP). UDP se získává za použití glukóza-1-fosfátu při reakci katalyzované pyrofosforylázou

(uridindifosfát-glukózou). V tomto stádiu intracelulární enzymy katalyzují vnitřní přeměnu UDP-glukózy na jiné cukry (např. UDP-glukuronovou kyselinu), čímž vznikají různé monosacharidy cukru. Posledním krokem biosyntézy je sekrece exopolysacharidu do vnějšího prostředí buňky. Sekrece EPS je pro bakterie náročný proces, ve kterém hydrofilní polymery s vysokou molekulovou hmotností vytvořené v cytoplazmě musí procházet buněčnou stěnou do extracelulárního prostředí buňky. Cesty biosyntézy a exportu EPS u většiny gramnegativních bakterií se řídí jedním ze dvou mechanismů. Wzx-Wzy závislá dráha, ve které jsou jednotlivé opakující se polymerní jednotky tvořeny na vnitřní straně cytoplazmatické membrány a polymerizovány v periplazmě (prostor mezi vnitřní cytoplazmatickou membránou a vnější membránou gramnegativních bakterií) a ABC transportně závislá dráha, při které dochází k polymeraci na vnitřní straně cytoplazmatické membrány [5].

Na Obrázku 1 můžeme vidět biosyntetické dráhy, které se účastní bakteriální EPS syntézy gramnegativními bakteriemi. (a) Substrát vstupuje do buňky specifickým transportním mechanismem. (b) Substrát je nejprve katabolizován glykolytickými drahami na pyruvát, který se za aerobních podmínek převede na acetyl-CoA a vstoupí do cyklu trikarboxylové kyseliny. Primární metabolity produkované v těchto cestách se používají jako prekurzory pro biosyntézu malých biomolekul (např. aminokyseliny, ribonukleotidy a hexosaminy). (c) Fosforylované cukry jsou převedeny na energeticky bohaté monosacharidy, zejména nukleosidifosfátové cukry (NDP cukry – např. UDP-galaktóza, GDP-manóza). (d) Syntéza a polymerace polysacharidů probíhá jedním ze dvou mechanismů. V systému Wzx-Wzy (vlevo) je opakující se polymerní jednotka syntetizována sekvenčním přenosem monosacharidů z NDP-cukru na polyprenylfosfátový – lipidový nosič. Polymerní jednotka je transportována přes vnitřní membránu flipázou (Wzx) do periplazmatického prostoru, kde dochází k polymeraci polysacharidu působením polymerázy (Wzy). V ABC transportně závislém systému (vpravo) je polysacharid polymerován na cytoplazmatické ploše vnitřní membrány sekvenčním přidáním zbytků cukru na neredukující konec polymerního řetězce. Polymer je exportován přes vnitřní membránu díky ABC transportéru [6].



Obrázek 1: Schematický diagram shrnující biosyntetické dráhy, které se účastní bakteriální EPS syntézy gramnegativními bakteriemi [6]

2.3. Fukózové polysacharidy – FucoPol

FucoPol je biopolymer, extracelulární polysacharid s vysokou molekulovou hmotností ($4,19 \cdot 10^6$ – $5,80 \cdot 10^6$ Da), složený z neutrálních cukrů (fukóza, glukóza a galaktóza), kyselého cukru (kyselina glukuronová) a acylové skupiny (pyruvát, sukcinát a acetát). Přítomnost acylových skupin dává polymeru aniontový charakter a může podporovat interakce s ionty nebo jinými makromolekulami [7].

Tento polysacharid pochází z vlastního bio procesu. Je produkovaný bakterií *Enterobacter A47* a je přirozený zdroj čistých monosacharidů (L-fukóza, galaktóza, glukóza a kyselina glukuronová). Tento nový bakteriální biopolymer je přirozeným zdrojem pro efektivní výrobu čisté L-fukózy [8].

L-fukóza neboli 6-deoxy-L-galaktóza je jeden z monosacharidů obvykle přítomných v glykokonjugátech jako jsou glykoproteiny a glykolipidy. Vyskytuje se převážně v α -anomerické konfiguraci a bývá připojena různými typy vazeb např. O-glykosidovou vazbou na jiný sacharid – nejčastěji galaktózu nebo acetyl-D-glukosamin. L-fukóza patří mezi obtížně dostupné sacharidy. Chemická syntéza je velmi obtížná a drahá, stejně jako extrakce z rostlinných a živočišných tkání, kde je situace ještě komplikována dostupností zdrojových materiálů. Z těchto důvodů představuje bakteriální výroba FucoPolu velmi důležitý alternativní zdroj pro výrobu L-fukózy.

V lidském organismu jsou glykokonjugáty obsahující L-fukózu velmi četné. Byly detekovány např. v mozku a na synaptických spojích, což naznačuje roli v přenosu nervového signálu, ve fotoreceptorové vrstvě oční sítnice, v epidermálních buňkách kůže a v antigenech červených krvinek, čehož je využíváno při rozlišování krevních skupin. Důležitou roli nepochybně hrají i v reprodukčním procesu. Dále byly L-fukosylované glykokonjugáty detekovány v mateřském mléce, kde byla prokázána jejich schopnost inhibovat vazbu patogenů v trávicím traktu kojenců na specifické receptory, a tím zamezovat infekci buněk. Také přítomnost glykokonjugátů na povrchu bakteriálních buněk hraje důležitou roli v rozpoznávání a imunitní reakci vyšších organismů na infekci [9].

2.3.1. Produkce a purifikace FucoPolu

Pro kultivaci bakterie *Enterobacter A47* a tvorbu extracelulárního polysacharidu bohatého na fukózu je nutný zdroj uhlíku. Používají se zbytky biomasy, zejména z ostatních průmyslových výrob nebo odpadní voda bohatá na rozpuštěnou organickou hmotu.

Pro kultivaci bakterie *Enterobacter A47* a tvorbu extracelulárního polysacharidu bohatého na fukózu byla použita rajčatová pasta. Produkovaný polymer měl typickou kompozici FucoPolu (37 mol. % fukózy, 27 mol. % galaktózy, 23 mol. % glukózy a 12 mol. % kyseliny glukuronové, s obsahem acylových skupin 13 hm. %). Kultura byla reaktivována z kryokonzervovaného zásobního roztoku Luria Bertani (LB, výživné médium používané pro růst bakterií) inokulací na agarových plátech. V bioreaktoru byl *Enterobacter A47* pěstován na minerálním médiu s roztokem mikroživin. Minerální médium bylo doplněno rajčatovou pastou. Inokulum (zárodek) kolonie, kultivované na LB médiu byl dále inkubován a následně centrifugován. Další kultivace byla prováděna při 30 °C a pH 7 v bioreaktoru po dobu 3 dnů. Kultivační produkt byl zředěn deionizovanou vodou z důvodu redukce viskozity a byl vložen do odstředivky, kde došlo k oddělení buněk. Takto získaný supernatant byl dále tepelně zpracován a přečištěn. Výsledný roztok byl zmražením vysušen. Vzniklý polymer byl dále

skladován při pokojové teplotě. Rajčatová pasta byla poprvé použita jako substrát pro výrobu mikrobiálního polymeru. Ukázalo se, že je vhodným zdrojem živin, včetně cukrů, amoniaku a fosfátu, pro růst *Enterobacter A47* a syntézu exopolysacharidů. Tato pasta je tedy vhodným nízko nákladovým substrátem pro výrobu FucoPolu [10].

Dále se FucoPol připravoval kultivací bakterie v roztoku glycerolu za použití LB média. Postup byl v tomto případě shodný s předchozím [8].

Studii bylo také zjištěno, že syntéza EPS enzymem z *Enterobacter A47* je ovlivněna koncentrací fosfátu v médiu. Pro koncentrace $8,8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosfátu byl výtěžek bioprodukce nejvyšší a obsah fukózy v polymeru byl v rozmezí 30-36 mol. %. Změnou koncentrace fosfátu také dochází k modifikaci složení a změně molekulové hmotnosti výsledného polymeru. Dalším faktorem ovlivňující syntézu EPS jsou podmínky prostředí jako je teplota a pH, které mohou významně ovlivňovat složení polymeru zejména přidáváním dalších monomerů cukrů (ramnóza, kyselina glukuronová a glukosamin) [11].

Dalším zajímavým způsobem pro přípravu FucoPolu je použití syrovátky. Sывátka, jako vedlejší produkt mlékárenského průmyslu, je bohatá na laktózu. Pro valorizaci syrovátky se používají biotechnologické zdroje, které vytváří produkty jako je bioethanol, bioplyn, organické kyseliny, elektřinu, proteiny a mikrobiální polysacharidy. Většina bakterií produkující EPS není schopna účinně používat laktózu jako zdroj uhlíku kvůli její nízké koncentraci. Bakterie *Enterobacter A47* byla schopna využít laktózu ze syrovátky pro buněčný růst, ovšem s nižší specifickou rychlostí růstu než v předchozích případech. Sывátka kromě laktózy obsahovala některé bílkoviny, minerály a vitamíny, které mohly stimulovat buněčný růst [12].

2.3.2. Využití FucoPolu

Potravinové obaly mají v potravinářském průmyslu zásadní význam pro poskytování kvalitních výrobků spotřebiteli tím, že chrání potraviny před poškozením nebo kontaminací. Syntetické petrochemické obalové materiály jsou běžnou volbou díky kombinaci vlastností, jako je pružnost, pevnost, lehkost, stabilita, teplotní odolnost, nepropustnost, nízká cena a snadnost sterilizace. Nicméně vzhledem k jejich nedegradovatelnosti syntetické plastové obaly přispívají k tvorbě plastového odpadu. Dobrá alternativa k řešení tohoto ekologického problému spočívá v použití biologických materiálů z obnovitelných zdrojů, zejména použitím biopolymerů, které zahrnují polysacharidy [13].

Bakteriální exopolysacharid FucoPol se může využít k přípravě biologicky odbouratelných fólií spojením filmogenního roztoku složeného z polymeru a kyseliny citronové. Připravené fólie jsou průhledné s lehce hnědým tónem a jsou velice flexibilní při manipulaci. Průhlednost je vyšší než u fólií z jiných biopolymerů, jako je chitosan nebo želatina, a je blízká hodnotě průhlednosti pro syntetické fólie jako je např. polyethylen s nízkou hustotou (LDPE). Fólie FucoPol jsou hydrofilní a zcela rozpustné ve vodě. Vykazují také dobré bariérové vlastnosti pro plyny (O_2 , CO_2). Vzorke fólií vykazující obsah vody $8 \pm 0,4 \%$ byly podrobeny zkouškami tahem. Výsledky ukazují, že fólie FucoPol vykazují typické chování tvárné fólie. Byla prokázána nízká pevnost v tahu ($3,1 \pm 0,3 \text{ MPa}$), vysoké prodloužení při přetržení ($54,9 \pm 4 \%$) a modul pružnosti byl stanoven na $2,8 \pm 0,2 \text{ MPa}$. V potravinářském průmyslu je u obalových fólií jedním z nejdůležitějších parametrů poměr propustností CO_2/O_2 , který určuje relativní podíl oxidu uhličitého a kyslíku v obalu. Tento poměr je také závislý na relativní vlhkosti, která

určuje obsah vody v polymerní matrici. Při srovnání FucoPol a LDPE fólií lze pozorovat, že FucoPol fólie vykazují menší propustnost kyslíku a téměř stejné hodnoty pro propustnost oxidu uhličitého. Fólie FucoPol mohou být využívány pro balení potravin v ochranné atmosféře.

Mechanické vlastnosti polysacharidových fólií silně závisí nejen na vlastnostech použitého biopolymeru, ale také na použití plastifikátorů a dalších aditiv. Mechanické vlastnosti fólií FucoPol vykazují polymerní strukturu, která není dostatečně mechanicky odolná, aby mohla být použita samostatně. Existuje však potenciál jejího využití například jako hydrofilní vrstva zabudovaná do vícevrstvého materiálu [7].

FucoPol byl použit i jako bioadhezivní polymer. 3 hm. % roztoku FucoPolu se připravil rozpuštěním polymeru v deionizované vodě za intenzivního míchání při pokojové teplotě během 12 hodin. Takto získaný roztok se zahříval při teplotě 50 až 60 °C po dobu 6 hodin, odpařila se část rozpouštědla a roztok se koncentroval. Získal se roztok FucoPol s koncentrací přibližně 7,6 hm.% a použil se jako adhezivní přípravek v několika zkouškách. Byla studována viskozita a viskoelastické vlastnosti přípravku za použití rheometru s řízeným napětím. Adhezivní pevnost byla stanovena pomocí smykové pevnosti. Roztok FucoPol byl použit k lepení různých materiálů – balsového dřeva (přírodní organický materiál), skla (anorganický materiál), vlnité lepenky (zpracovaný přírodní materiál) a film acetát celulózy (polysyntetický materiál). S cílem porovnat FucoPol s komerčními syntetickými lepidly, vzorky byly lepeny univerzálním lepidlem UHU za stejných podmínek. Nejvyšší přilnavost byla zjištěna u balsového dřeva lepených FucoPolem, protože maximální pevnost dostupného zařízení ($742,2 \pm 9,8$ kPa) nebyla dostatečná k oddělení lepených vzorků. Podobné chování bylo pozorováno u komerčního lepidla UHU Universal. Nejvyšší přilnavost je u dřeva zřejmě proto, že hrubý povrch dřeva umožňuje pronikání lepidla do dřevěné matrice, čímž je dosaženo vyšší interakce lepidla a dřeva a výsledkem je tím pádem silnější vazba. Některé mikrobiální polysacharidy mohou být využívány jako lepidla na dřevo. Bylo prokázáno, že pullulan, xanthan a levan mají vysokou přilnavost k různým druhům dřevěných materiálů (např. borovice, javor, dřevotříska) s hodnotami smykové pevnosti nad 2000 kPa. Na druhou stranu polysacharidový adhezivně viskózní exopolysacharid (PAVE) syntetizovaný kmeny *Alteromonas colwelliana* vykazoval hodnotu smykové pevnosti 545 kPa, což je nižší než hodnota získaná pro FucoPol. Vzhledem k těmto výsledkům lze konstatovat, že lepidlo FucoPol má potenciál využití jako lepidlo na dřevo, protože odolává smykové síle alespoň $742,2 \pm 9,8$ kPa. Pro vlnitou lepenku byla smyková pevnost FucoPolu a UHU lepidla téměř stejná a to kolem 420 kPa. U skla a filmu acetát celulózy byla naopak tato pevnost nejvyšší u FucoPolu a to 115,1 kPa u skla a 153,7 kPa u acetát celulózy [14].

2.4. Metody charakterizace exopolysacharidů

Chemická charakterizace polysacharidů je velice důležitá pro vědecké a průmyslové aplikace. Úspěšná optimalizace a vývoj procesů pro jejich charakterizaci jsou dnes možné pouze se znalostí a ovládáním detailů na molekulární úrovni. Od roku 1922, kdy Hermann Staudinger objevil skutečnou povahu polymerů, bylo vyvinuto velké množství analytických metod, které pomohly zjistit chemické složení polymerů ve všech jeho aspektech a strukturních úrovních. Techniky charakterizace se obvykle používají k určení molekulové hmotnosti, molekulární struktury, morfologie, tepelných vlastností a mechanických vlastností [15].

Molekulární charakterizace používá běžné metody z fyzikální chemie. Někdy lze použít spektroskopické metody. Některé běžné spektroskopické techniky jsou UV-VIS absorpční spektroskopie, infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR), Ramanova spektroskopie, nukleární magnetická rezonance (NMR), elektronová paramagnetická (spinová) rezonance (EPR) a hmotnostní spektrometrie (MS). Tyto techniky jsou obvykle zaměřeny na získávání informací o chemické struktuře polymerních materiálů.

Makroskopické měření vlastností lze označit jako klasickou charakterizaci exopolysacharidu. Zahrnuje makroskopický vzorek, často v konečné pevné formě, a provádí experimenty, které poskytují informace o vlastnostech. Některé z důležitějších vlastností zahrnují tepelné vlastnosti, mechanické vlastnosti, viskozitu taveniny, viskoelasticitu, tření a elektrické vlastnosti [16, 17].

Tabulka 2: Některé techniky pro charakterizace EPS [18]

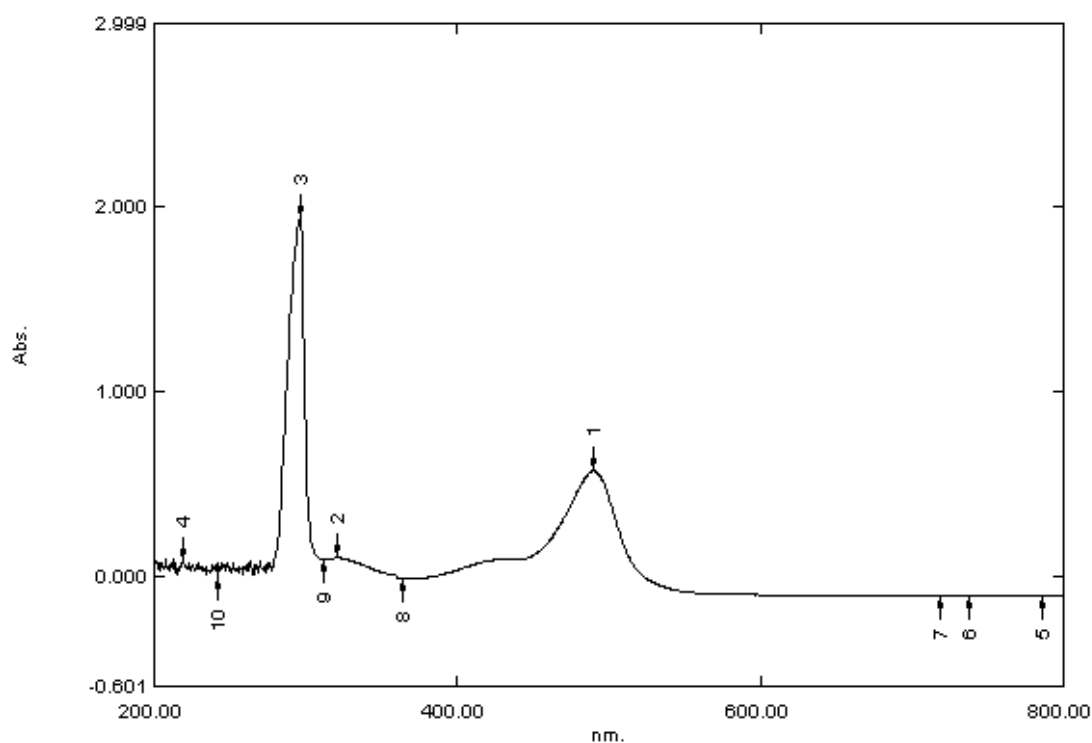
Metoda	Charakteristika
Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR)	Složení monosacharidů
Viskozimetrie	Viskozita
Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC)	Složení monosacharidů
Rozměrově vylučovací (gelová permeační) chromatografie s více úhlovým rozptylem světla SEC-MALLS	Molekulová hmotnost
Plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS)	Složení monosacharidů a jejich uspořádání
Kapilární elektroforéza (CE)	Uspořádání monosacharidů
Vysokoúčinná aniontová chromatografie (HPAEC)	Uspořádání monosacharidů
Rentgenová difrakce (XRD)	Molekulární struktura a konformace, modelace

2.4.1. Kolorimetrická metoda (metoda fenol-kyselina sírová)

Metoda fenol-kyselina sírová je kolorimetrická metoda široce používaná k určení celkové koncentrace sacharidů. Monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy se převedou na furfuralové deriváty působením kyseliny sírové při zvýšené teplotě a deriváty furfuralu pak reagují s fenolem za vzniku barevných sloučenin. Metoda je jednoduchá a citlivá. Experiment není podstatně ovlivněn přítomností proteinů a výsledná barevná stabilita je přes 160 minut.

Kolorimetrická analýza všech roztoků je prováděna za použití spektrofotometru v UV-VIS oblasti. Absorbance charakteristické žlutooranžové barvy je měřena při 490 nm pro monosacharid hexózy a 480 nm pro monosacharid pentózy a uronovou kyselinu. Z kalibračních křivek známých sacharidů jako standardů je možné stanovit koncentraci polysacharidů jako množství hexózových a pentózových cukrů.

Při stanovování obsahu polysacharidů v extraktech z ucha Jidášova (*Auricularia auricula*) a Rosolovky řasotvaré (*Tremella fuciformis*) byl stanoven pomocí metody fenol-kyselina sírová. Do zkumavky byly pipetovány 2 ml standardních cukrových roztoků, 2 ml vyčištěných polysacharidů z extraktu těchto hub a 1 ml 5% fenolových roztoků. Pak se rychle přidalo 5 ml koncentrované kyseliny sírové. Zkumavky byly protřepávány a umístěny do vodní lázně vyhřáté na teplotu 30 °C. Kolorimetrická analýza všech roztoků byla provedena za použití spektrofotometru UV-VIS. Množství polysacharidů v houbových extraktech bylo stanoveno jako množství hexóзовých a pentóзовých cukrů za použití kalibračních křivek manózy, glukózy a xylózy [19].



Obrázek 2: Absorpční spektrum vzorku vyčištěného polysacharidového extraktu z Jidášova ucha při reakci fenol-kyselina sírová [19]

2.4.2. Gelová permeační chromatografie (GPC)

Gelová permeační chromatografie je v současné době nejpoužívanější a nejrozvinutější technologií pro stanovení molární hmotnosti polysacharidů. Porézní nosič obsahuje hydrofilní gelové částice, uvnitř kterých jsou póry o různých poloměrech. Prostor mezi gelovými částicemi je vyplněn mobilní fází (rozpuštědlem). Když směs polysacharidů protéká nosičem, jednotlivé molekuly jsou více či méně schopny zadržet se v pórech gelových částic. Nejmenší molekuly se dostávají do pórů gelu nejsnadněji, a tudíž jsou nejvíce zadržovány a procházejí kolonou nejpomaleji. Větší rozpuštěné látky budou eluovat rychleji než menší. Rozdíl v migračních rychlostech tak nastává kvůli zadržení molekul stacionární fází. Na vykresleném chromatogramu můžeme vidět přítomnost jednotlivých analytů v podobě charakteristických píků. Molární hmotnost polysacharidu se poté stanoví z kalibrační křivky standardu polysacharidu (např. dextranu, pullulanu) [20].

Rozměrově vylučovací (gelová permeační) chromatografie s víceúhlovým rozptylem světla SEC-MALLS je metoda, která umožňuje separaci různých polymerních sloučenin, stanovení

molekulové hmotnosti, výpočet polydisperzity či stanovení konformace polymeru. Mobilní fáze koluje přístrojem, neustále promývá kolonu, na níž probíhá separace jednotlivých molekul polymeru podle velikosti částic. Za kolonou se nachází detektor, který snímá víceúhlový rozptyl světla celkem pod osmnácti úhly. Vzorky jsou osvětleny laserem o určité vlnové délce.

Molekulová hmotnost polysacharidového peptidu z Lesklokorky lesklé (*Ganoderma lucidum*) byla identifikována za použití vysokoúčinné gelové permeační chromatografie s HPLC zařízením vybavené pumpou, permeační kolonou a detektorem indexu lomu. Jako mobilní fáze byla použita voda (stupeň HPLC) s gradientovou elucí při 35 °C. Standardy dextranu v rozmezí molární hmotnosti 2 500–84 400 g·mol⁻¹ byly použity pro sestavení kalibrační křivky. Pomocí kalibrační křivky dextranu byla stanovena hodnota molární hmotnosti polysacharidu [21].

2.4.3. Hydrodynamická chromatografie (HDC)

Další metodou pro stanovení molární hmotnosti polysacharidů je hydrodynamická chromatografie, která je v mnoha ohledech obdobou GPC. Na rozdíl od gelové chromatografie stacionární fáze obsahuje částice, které nemají póry, takže separační mechanismus je poněkud odlišný. Principem separace je rozdíl v transportních rychlostech jednotlivých molekul v kapiláře vzhledem k rozpouštědлу. Velké molekuly se vzhledem ke své velikosti nemohou dostat až ke stěnám kapiláry, nacházejí se tedy v jejím středu, kde je rychlost rozpouštědla nejvyšší, a budou se tedy vymývat rychleji než menší. Menší molekuly se pohybují u stěn kapiláry, kde je rychlost mobilní fáze nejmenší. U hydrodynamické chromatografie je tedy pořadí eluce stejné jako u gelové permeační chromatografie, velké částice se eluují dříve než částice malé [22].

2.4.4. Vysokoúčinná aniontová chromatografie (HPAEC)

Vysokoúčinná aniontová chromatografie (HPAEC) při vysokém pH spolu s pulzní elektrochemickou detekcí (PED) je jednou z nejužitečnějších metod stanovení sacharidů. Technika má velký vliv na analýzu oligo a polysacharidů. Kompatibilita elektrochemické detekce s gradientovou elucí, spojená s vysokou selektivitou stacionárních fází výměny aniontů, umožňuje, aby se v jednoduché fázi oddělily směsi jednoduchých cukrů, oligosacharidů a polysacharidů s vysokým rozlišením [23].

Vzorky polysacharidů obsahující fukózu z extraktů žampionu mandlového (*Agaricus subrufescens*) byly hydrolyzovány na volné cukry a byly analyzovány vysokoúčinnou aniontovou chromatografií s pulzní amperometrickou detekcí (HPAEC-PAD). Zařízení HPAEC-PAD se skládalo z kolony, ochranné kolony, čerpadla, vstřikovacího ventilu a elektrochemického detektoru se zlatou pracovní elektrodou. Pro separaci neutrálních monosacharidů se použil eluent hydroxidu sodného a octanu barnatého. Pro separaci kyselých monosacharidů (kyselina galakturonová a kyselina glukuronová) se aplikoval eluent hydroxidu sodného, octanu sodného a octanu barnatého. Data byla shromážděna a analyzována pomocí příslušného softwaru [24].

2.4.5. Nukleární magnetická rezonanční spektrometrie (NMR)

Princip NMR spektroskopie obecně spočívá v interakci magneticky aktivních jader s vnějším magnetickým polem, následované přesně definovanou excitací radiofrekvenčním pulzem

a snímáním dat (magnetizace, napětí v detekční cívce) během jejich relaxace. Magneticky aktivní, a tedy v NMR detekovatelná, jsou jádra s nenulovým jaderným spinem (^1H , ^{13}C , ^{27}Al , ^{29}Si atd.). Jejich jaderné interakce s magnetickým polem jsou závislé na orientaci molekuly vzhledem k vnějšímu magnetickému poli [25].

Ve studii zabývající se strukturní charakterizací polysacharidu získaného z červených mořských řas *Gracilaria caudata* byla pro stanovení chemické struktury polysacharidové frakce použita chemická analýza ^{13}C a ^1H NMR spektroskopie. ^{13}C a ^1H NMR spektra 2,5 hm. % roztoků v těžké vodě byly zaznamenány na spektrometru. Jako vnitřní standard byla použita kyselina 4,4-dimethyl-4-silapentan-1-sulfonová (DSS). Jednotlivá spektra byla vynesena pomocí pulzních programů. Složení a strukturní údaje o polysacharidech byly analyzovány pomocí příslušného softwaru [26].

2.4.6. Plynová chromatografie – hmotnostní spektrometrie (GC/MS)

GC/MS je analytická metoda, která se používá k analýze komplexních organických a biochemických těkavých směsí. Plynový chromatograf nejprve rozdělí směs na jednotlivé složky a potom se použije detektor hmotnostního spektrometru, kde jsou tyto složky jednoznačně identifikovány. Kombinace těchto dvou technik umožňuje kvantitativní a kvalitativní analýzu těkavé směsi. Aby se mohly polysacharidy charakterizovat pomocí GC/MS, musí být chemicky přeměněny na těkavé látky postupným procesem methylace, hydrolýzy, redukce a acetylace. Tento proces přeměny umožňuje, aby byly polysacharidy rozloženy na částečně methylované octany alditolu (PMAAs), které jsou dostatečně těkavé pro analýzu. Tento proces také umožňuje stanovit polohy glykosidických vazeb mezi jednotlivými monosacharidy daného polysacharidu [27].

2.4.7. Spektroskopické metody charakterizace

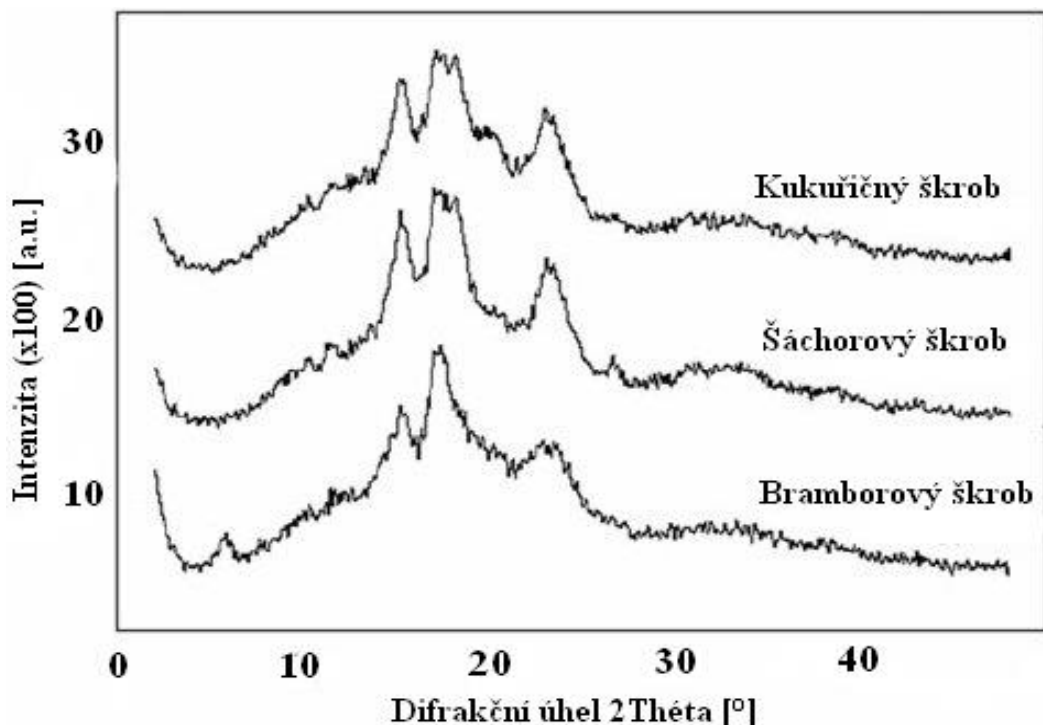
Hlavní techniky pro stanovení chemického složení zahrnují absorpci elektromagnetického záření biopolymery. Hlavními techniky jsou infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR), Ramanova spektroskopie, nukleární magnetická rezonance (NMR), rentgenová difrakční analýza.

Infračervená spektroskopie se zabývá infračervenou oblastí elektromagnetického spektra. To je světlo s delší vlnovou délkou a nižší frekvencí než viditelné světlo. Zahrnuje řadu technik, většinou založených na absorpční spektroskopii. Molekuly absorbují specifické kmitočty, které jsou charakteristické pro jejich strukturu. Ze získaných pásových spekter lze kvalifikovat i kvantifikovat vzorek [16].

Ramanova spektroskopie je spektroskopická technika používaná k pozorování vibračních, rotačních a jiných nízkofrekvenčních stavů v systému. Metoda využívá tzv. Ramanův jev, ke kterému dochází při interakci laserového paprsku s elektrony zkoumaného materiálu. Vzorek je osvětlen monochromatickým laserovým paprskem, který interaguje s molekulami vzorku a vzniká rozptýlené světlo. Rozptýlené světlo, které má jinou frekvenci než spektrum dopadajícího světla, se používá ke konstrukci Ramanova spektra. Ramanova spektra vznikají kvůli nepružné kolizi mezi náhodným monochromatickým zářením a molekulami vzorku [28].

Techniky rentgenové difrakce mohou být použity ke studiu krystalinity biopolymerů. Rentgenová krystalografie je nástroj používaný k identifikaci atomové a molekulární struktury krystalu, ve kterém krystalické atomy způsobují, že se svazek dopadajících rentgenových

paprsků ohýbá do různých směrů. Měřením úhlů a intenzity těchto difrakčních paprsků může krystalograf produkovat trojrozměrný obraz hustoty elektronů uvnitř krystalu. Z této hustoty elektronů lze určit střední polohu atomů v krystalu, chemické vazby a další informace o struktuře biopolymeru [16].



Obrázek 3: Vzorky rentgenové difrakce prášku z bramborového, šáchorového a kukuřičného škrobu [29]

2.4.8. Termo-analytické metody charakterizace

Metody termické analýzy se staly nepostradatelnou analytickou technikou pro charakterizaci polymerů. Technika charakterizace poskytuje relevantní informace o tepelné a chemické stabilitě, teplotách fázového přechodu, kinetice a reologii. Poskytuje informace o vztahu mezi chemickou strukturou a jejich fyzikálními vlastnostmi. Zahrnuje skupinu technik, ve kterých jsou fyzikální vlastnosti materiálu měřeny jako funkce teploty. Kalorimetrie spočívá v měření tepla emitovaného anebo absorbovaného během termodynamických přechodů nebo chemických reakcí. Přehled metod termické analýzy, jejich zkratk a sledovaných fyzikálních vlastností najdeme v Tabulce 3.

Termogravimetrická analýza neboli termogravimetrie (TG) je metoda, při které se sledují energetické změny vzorku v důsledku změny teploty anebo tepelného toku. Sledují se tedy úbytky hmotnosti vzorku způsobené vlivem teploty [30].

Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) je metoda měření, která umožňuje měření tepelného toku ve vzorku. DSC lineárně ohřívá nebo ochlazuje vzorek a měří rozdíl teplot nebo energii, kterou je nutno dodat, aby vzorek a referenční látka měly stejnou teplotu. Jako reference se při měření na DSC používá téměř vždy prázdná měřící cela. Řídící jednotka zajišťuje konstantní rychlost ohřevu obou vzorků po dobu experimentu. Měří se tedy množství tepla absorbovaného nebo emitovaného vzorky procházejícími cykly ohřevu nebo chlazení. Rozdíl

v tepelném toku představuje signál DSC, který nám umožňuje získat představu o chemických a fyzikálních změnách probíhajících v měřeném vzorku. Výhodou DSC je potřeba malého množství vzorku. Diferenciální skenovací kalorimetrie je jednou z důležitých metod používaných ke studiu tepelného chování biopolymerů.

Diferenciální termická analýza (DTA) je termo-analytická technika, podobná diferenciální skenovací kalorimetrii. DTA je starší technika, která je nyní obecně nahrazena DSC. V DTA se zkoumaný materiál a inertní reference podrobí stejným teplotním cyklům, zatímco se zaznamenává jakýkoli teplotní rozdíl mezi vzorkem a referencí. Změny ve vzorku, buď exotermické nebo endotermické, mohou být detekovány vzhledem k inertní referenci. Křivka DTA tedy poskytuje údaje o transformacích, které se vyskytly, jako jsou skelné přechody, krystalizace, tavení a sublimace. Vzorek a reference jsou vyhřívány stejným zdrojem. Referenční látka neboli standard musí být při zvolených teplotách experimentu inertní. Nejčastěji se používá Al_2O_3 , MgO , pro organické látky n-oktanol nebo polyethylen. Podle vlastností měřených vzorků se volí rozsah teplot přístroje, vhodná kalibrace a odpovídající referenční vzorek. Na experimentální měření má vliv, stejně jako u DSC, především rychlost ohřevu, hmotnost vzorku, ale i atmosféra v pracovní komůrce [16, 30].

Tabulka 3: Metody termické analýzy, jejich zkratky a sledované fyzikální vlastnosti [30]

Metoda termické analýzy	Zkratka	Sledovaná fyzikální vlastnost
Termogravimetrie	TG	hmotnost
Diferenční termická analýza	DTA	Rozdíl teplot
Diferenční skenovací kalorimetrie	DSC	Rozdíl teplot/energie
Termodilatometrie	TD	Lineární nebo objemové změny
Termomechanická analýza	TMA	Deformace vzorku
Diferenční tlaková analýza	DPA	Tlak
Termomikroskopie	HSM	Změny vzhledu
Termoelektrometrie		elektrické vlastnosti vzorku

2.4.9. Charakterizace mechanických vlastností a další metody charakterizace

Charakterizace mechanických vlastností v polymerech se typicky týká míry pevnosti polymerního filmu. Pevnost v tahu a Youngův modul pružnosti jsou zvláště zajímavé pro popis vlastností napětí a deformace polymerních filmů. Dynamická mechanická analýza je nejobvyklejší technikou používanou k charakterizaci viskoelastického chování. Dalšími metodami charakterizace jsou měření viskozity, reologických vlastností a tvrdosti [16].

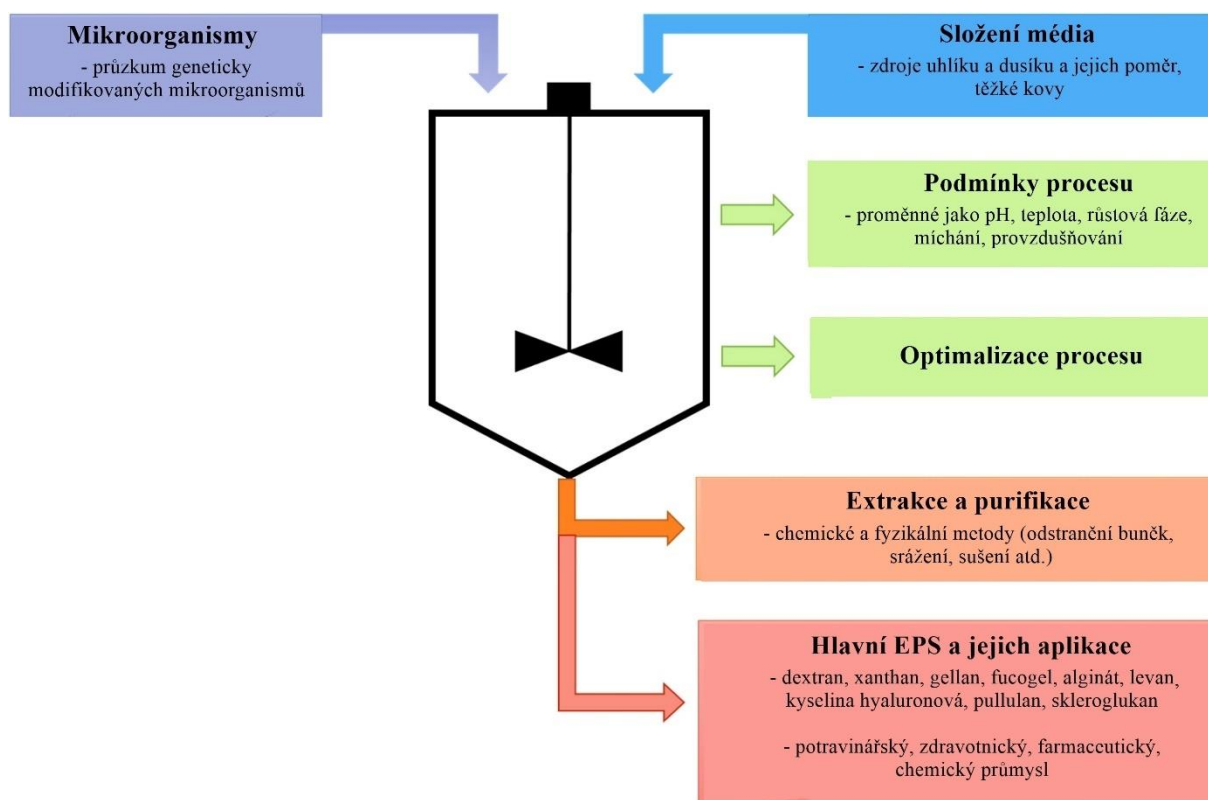
Reologie se zabývá tokem a deformacemi materiálů vlivem vnějších mechanických sil. Jsou možné dva mezní typy chování. Jestliže účinkem vnější síly nastane deformace, která vratně vymizí po jejím odstranění, mluvíme o elastickém chování. Je vykazováno tuhými látkami. Energie vynaložená na deformaci se ukládá, a po relaxaci tuhé látky se uvolní. Jestliže působením síly hmota teče a tok se zastaví ale neobráť, je-li síla odstraněna, mluvíme o viskózním chování. Je charakteristické pro jednoduché tekutiny. Vynaložená energie je disipována jako teplo. Mezi těmito dvěma extrémy jsou systémy, jejichž odezva na vyvinutou

sílu záleží na době, po kterou tato síla působí, nazývají se viskoelastické. K nim patří řada koloidně disperzních systémů.

Polymerní gely jsou trojrozměrné sítě tvořené řetězci makromolekul (polymerů), které jsou vzájemně propojeny vazbami chemickými nebo fyzikálními. Polymerní gely se chovají jako viskoelastické pevné látky. Gely mohou být měkké a deformovatelné, ale také mohou držet svůj tvar jako pevná látka. V závislosti na fyzikální struktuře polymerní sítě mohou být polymerní gely klasifikovány jako silné, slabé nebo pseudogely. Chemicky zesíťené polymerní gely jsou považovány za silné gely, které jsou stálé, mají pevné spoje, a proto jsou elastické. Slabé gely obsahují zesíťení, které může být narušeno i při malých mechanických napětích, při větších napětích dochází k trvalé deformaci a systém se začne chovat jako viskózní kapalina. Slabé gely jako například koloidní gely a některé biopolymerní gely. Propletené polymerní systémy jsou někdy označovány jako pseudogely, protože fyzikální spletení mezi polymerními řetězci napodobují chemické zesíťení, které těmto materiálům dodává gelové vlastnosti [31, 32].

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Mikrobiální exopolysacharidy (EPS) jsou velmi důležitou skupinou sloučenin, které mohou být vylučovány bakteriemi, houbami a řasami. Biotechnologická výroba těchto látek představuje lepší alternativu ve srovnání s chemickou a rostlinnou produkcí. Exopolysacharidy jsou biotechnologicky velice významné kvůli své aplikaci v různých průmyslových odvětvích díky jejich fyzikálním a chemickým vlastnostem. Bylo zjištěno, že většina výzkumných prací je zaměřena na izolaci a charakterizaci nových exopolysacharidů právě z mikrobiálních zdrojů.



Obrázek 4: Obecné schéma biotechnologické cesty pro získání hlavního mikrobiálního EPS [33]

Biotechnologická výroba EPS je výhodnější zejména kvůli rychlé výrobě během několika dní a také možnosti využití průmyslových a zemědělských odpadů jako substrátu. Výrobní náklady mohou ovšem být velmi vysoké. Současné výzkumy se zaměřují na netoxické EPS, a hlavně na ekologickou produkci EPS. V současné době se mnoho EPS vyrábí prostřednictvím biotechnologie. Každý EPS má svou vlastní biosyntetickou dráhu a následně faktory, které mohou tyto dráhy ovlivnit. Normálně se biosyntéza a akumulace EPS objevuje po růstové fázi mikroorganismu a jejich syntéza může být rozdělena do 4 různých kroků: 1. asimilace zdroje uhlíku, 2. syntéza jednotek opakujících se oligosacharidů, 3. sestavení polysacharidu z opakujících se jednotek a 4. export EPS do extracelulárního média.

Metody extrakce EPS lze rozdělit na chemické a fyzikální. Chemické metody zahrnují použití alkalické kyseliny, kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) a kationtoměničové pryskyřice, která může kontaminovat extrahované produkty. Mezitím fyzikální metody zahrnují centrifugaci, ultrazvuk a zahřívání, ty obvykle vykazují nižší účinnost ve srovnání s chemickými metodami. V posledních letech bylo vyvinuto a optimalizováno velké množství

metod pro extrakci mikrobiálního EPS. Byly popsány tři základní kroky, které zahrnují chemické a fyzikální metody, pro extrakci EPS z kultivačního média: odstranění buněk, precipitace polymeru a sušení. Odstranění buněk se normálně provádí za použití centrifugace, zatímco srážení se provádí za použití srážecího činidla, kterým je rozpouštědlo mísitelné s vodou (například methanol, ethanol, isopropanol nebo aceton). Pokud je polysacharid tepelně stabilní, může být tepelně upraven. Tepelná úprava je vhodná pro destrukci enzymů, které mohou degradovat EPS [18, 33].

Kultury produkující EPS jsou široce používány v mléčných výrobcích. Dodávají jim potřebnou viskozitu, stabilitu, vážou na sebe vodu, přispívají také ke struktuře výrobků a vnímání chuti spotřebitelem. Jednou z nejdůležitějších komerčních aplikací EPS je výroba jogurtů, ve kterých jsou bakterie kyseliny mléčné (např. *S. thermophilus*). Exopolysacharidy jako pullulan se používají jako částečná náhrada škrobu v těstovinách nebo pečených výrobcích. Roztoky pullulanu mají relativně nízkou viskozitu, připomínající arabskou gumu, která se používá jako plnivo s nízkou viskozitou v nápojích a omáčkách [18].

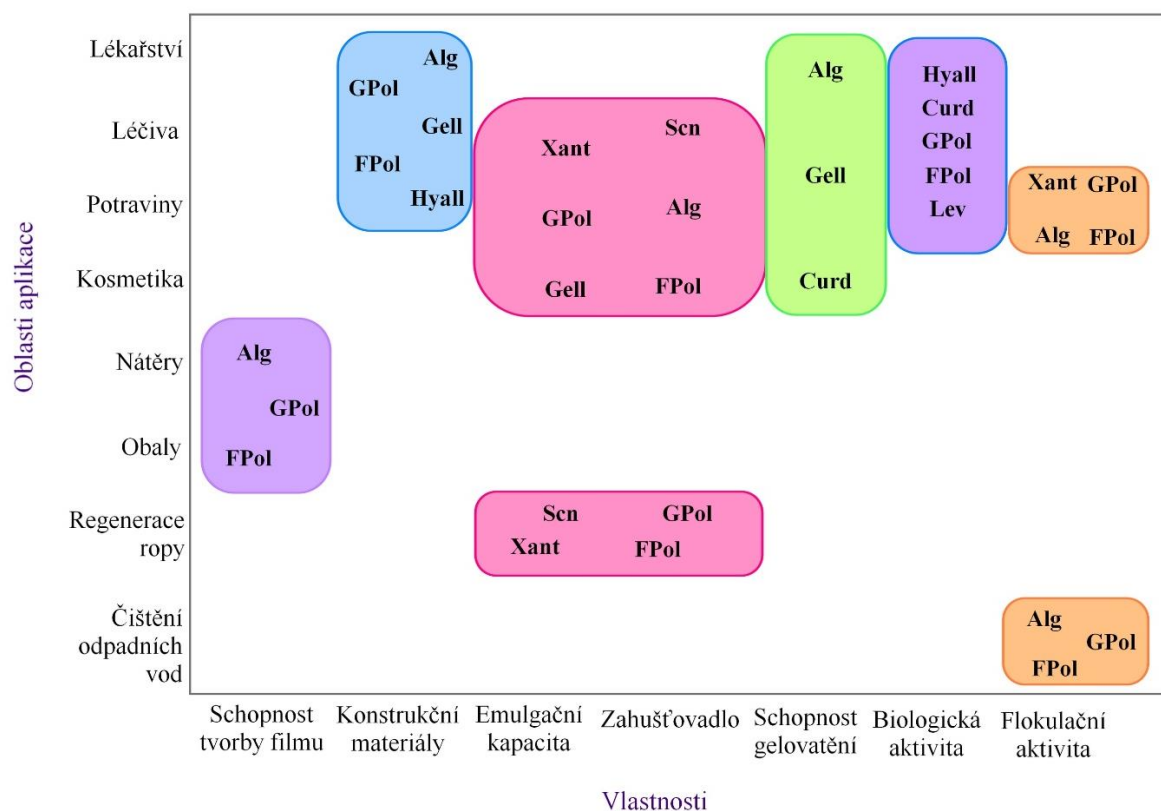
Botnání polysacharidů je jedna z nejpozoruhodnějších a nejužitečnějších vlastností. Botnání se projevuje při změně charakteru prostředí kolem EPS. V závislosti na polymeru může změna prostředí zahrnovat pH, teplotu nebo iontovou sílu a systém se může buď zmenšit nebo botnat při změně kteréhokoliv z těchto faktorů prostředí. S tímto se můžeme setkat hlavně ve farmaceutickém průmyslu, kde se využívá toho, že se léčivo začne uvolňovat až když polymer nabotná. Mnoho z potenciálně užitečných polymerů citlivých na pH nabotnává při vysokých hodnotách pH a spouští dodávání léčiva po zvýšení pH prostředí. Takové materiály jsou ideální pro systémy, jako je orální podávání, ve kterých se léčivo neuvolňuje při nízkých hodnotách pH v žaludku, ale spíše při vysokých hodnotách pH v horním tenkém střevě. EPS tedy hrají důležitou roli ve vývoji nových léčiv, a to nejen díky své schopnosti tvořit polymerní matrice, ale také díky své vlastní biologické aktivitě. Například xanthan, sulfátovaný dextran a sulfátovaný kurdlan se používají jako antivirotika a protirakovinová činidla. Dále využívaným EPS by mohl být v budoucnu FucoPol, který je díky vysokému obsahu fukózy považován za produkt s potenciálem pro použití v protinádorových, protizánětlivých a imunitně posilujících léčivech [6, 18, 33].

V kosmetice jsou EPS široce používány v krémech a pleťových vodách, kde působí jako humektant. Humektantem se rozumí hygroskopická látka, která hydratuje pokožku. Nejčastěji používanými humektanty v kosmetice jsou glycerol, močovina, kyselina hyaluronová a sorbitol.

Bakteriální EPS mají schopnost vázat těžké kovy. Například polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) jsou znečišťující látky v životním prostředí, které vznikají při spalování fosilních paliv a organických sloučenin. Vzhledem k potenciální toxicitě, mutagenitě a karcinogenitě PAHs představují závažné riziko pro životní prostředí a lidské zdraví. EPS obsahují velké množství negativně nabitých funkčních skupin a mají silné schopnosti vázat se na ionty těžkých kovů a organické polutanty.

V textilním průmyslu se EPS používají jako pojivo s barvivy nebo hydrogely díky svým vlastnostem, jako je viskozita, stabilizace a jeho schopnost zesílení s tkaninami. Inteligentní tkaniny jsou jednou z nových aplikací EPS. Hydrogel na bázi biopolymerů má výraznou fyzikální charakteristiku botnání a smrštění, které je ovlivněno vnější složkou, jako je pH,

teplota, rozpouštědlo, elektrické pole, světlo, napětí, iontová síla atd. Biopolymery, jako je chitosan, v kombinaci se syntetickými polymery se používají k výrobě hydrogelu, který je aplikován na povrchy tkanin. Tato úprava se využívá při aromatické úpravě tkanin. Podobně se vyrábějí také fotochromní textilie, na kterých ozařování světlem způsobuje přerušení kovalentní vazby mezi uhlíkem a kyslíkem fotochromní sloučeniny za vzniku iontových párů, které absorbují fotony viditelného světla a jsou barevné [18].



Obrázek 5: Diagram znázorňující korelaci mezi nejvýznamnějšími vlastnostmi polysacharidů s jejich hlavními oblastmi aplikace. Zkratky: Alg, bakteriální alginát; Curd, curdlan; FPol, FucoPol; Gell, gellanová guma; GPol, GalactoPol; Hyall, hyaluronan; Lev, levan; Scn, sukcinoglykan; Xant, xanthanová guma [6]

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Použité chemikálie

- FucoPol (vzorek získán z Universidade Nova de Lisboa, v rámci spolupráce na výzkumu FucoPolu)
- Dusičnan měďnatý trihydrát: Lach-Ner s.r.o., číslo šarže: PP/2012/06726, CAS: 10031-43-3, čistota: 99,0%
- Dusičnan kobaltnatý hexahydrát: Lach-Ner s.r.o., číslo šarže: PP/2016/03865, CAS: 10026-22-9, čistota: 99,2%
- Dusičnan olovnatý: Lach-Ner s.r.o., čísla šarže: PP/2010/07669, CAS: 10099-74-8, čistota: min. 99,0%
- Dusičnan zinečnatý hexahydrát: Sigma-Aldrich, číslo šarže: BCBW8137, CAS: 10196-18-6, čistota: $\geq 99,0\%$
- Dusičnan železitý nonahydrát: Penta s.r.o., číslo šarže: 2006080617, CAS: 7782-61-8, čistota: min. 98,0%
- Chlorid měďnatý dihydrát: Fluka, Sigma-Aldrich, číslo šarže: 1231238, CAS: 10125-13-0, čistota: $\geq 99,0\%$
- Chlorid kobaltnatý hexahydrát: Honeywell, Sigma-Aldrich, číslo šarže: BCBQ7124V, CAS: 7781-13-1, čistota: neuvedena
- Dusičnan sodný 0,1M
- Agaróza typ II-A, Medium EEO: Sigma-Aldrich, číslo šarže: SLBV2496, CAS: 9012-36-6, čistota: neuvedena
- Deionizovaná voda: PURELAB-flex, ELGA-LabWater, USA

4.2. Použité přístroje

- Izotermický titrační kalorimetr TAM III (TA Instruments)
- Centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf)
- Spektrofotometr UV/VIS Hitachi U-3900H (Hitachi High-Technologies)
- TGA Q5000 (TA Instruments)
- Elementární analyzátor EA 3000 (Eurovector).
- SEC-MALLS-dRI (kombinace Agilent Technologies a Wyatt Technology)

4.3. Charakterizace FucoPolu

Pro charakterizaci samostatného FucoPolu byla použita elementární analýza a termogravimetrie. Pomocí těchto metod byl zjištěn obsah popela, vlhkost vzorku a zastoupení základních organických prvků (C, O, H, N). Vzorek byl dále rovněž charakterizován určením průměrné molekulové hmotnosti a velikosti částic.

4.3.1. Elementární analýza a termogravimetrie

Definovaná navážka pevného vzorku FucoPolu byla podrobena charakterizaci z hlediska základních organických prvků pomocí elementární analýzy (EA 3000). Na stejném vzorku byla provedena termogravimetrická analýza (TGA Q5000), kterou byl stanoven celkový obsah organické hmoty a přítomnost anorganických nečistot v analyzovaném vzorku (= popel). Pro měření byla nastavena teplotní rampa 10,00 °C/min do 1000,00 °C.

4.3.2. Určení molekulové hmotnosti

Molekulová hmotnost FucoPolu byla stanovena pomocí velikostně vylučovací chromatografie (SEC) s víceúhlovým rozptylem světla (MALS) a diferenciální detekcí indexu lomu (dRI). Použitá mobilní fáze byla 0,1M roztok NaNO_3 , koncentrace vzorku FucoPolu pro analýzu byla $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (jako rozpouštědlo použita mobilní fáze – 0,1M NaNO_3) a objem nástřiku vzorku pro analýzu byl 50 μl . Před každou analýzou byly vzorky vždy přefiltrovány přes stříkačkový filtr (póry 0,45 μm , nylon).

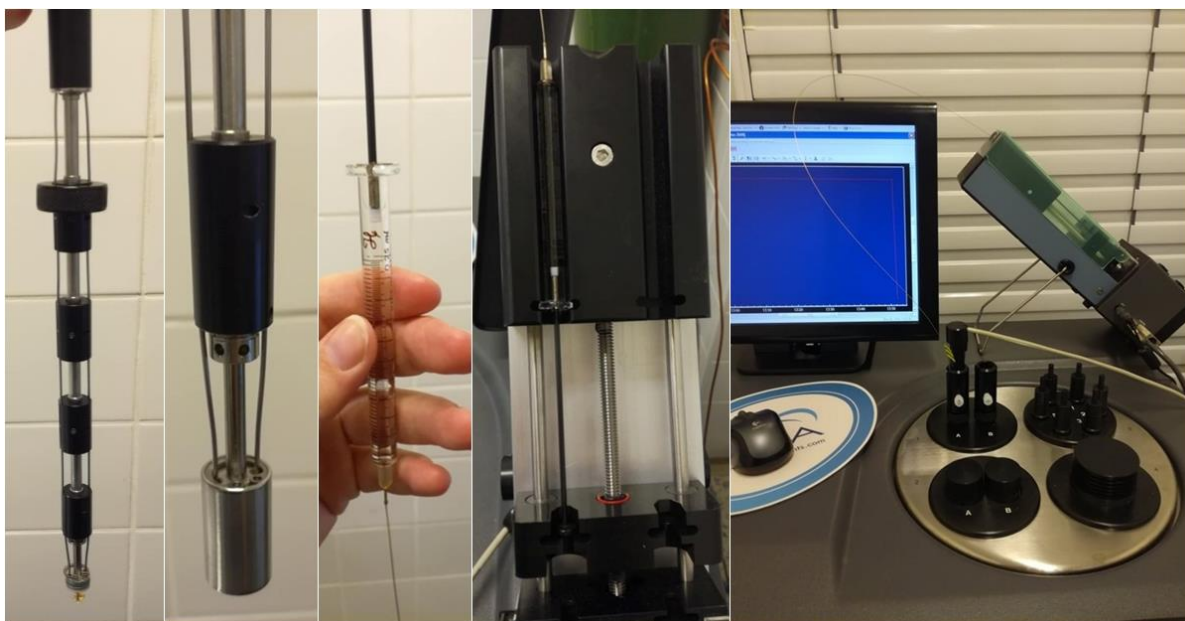
Pro získání správné hodnoty určené molekulové hmotnosti bylo rovněž nutné určit přesnou hodnotu inkrementu indexu lomu FucoPolu (dn/dc) v použité mobilní fázi. Pro tyto účely byly připraveny roztoky FucoPolu v koncentracích 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2; 1,5 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ v 0,1M NaNO_3 , které byly přefiltrovány přes filtr 0,45 μm . Jednotlivé připravené vzorky byly postupně nastříknuty pomocí injekčních stříkaček do diferenčního refraktometru (dRI) a ze změny naměřeného indexu lomu z koncentrací vzorku byla určena hodnota dn/dc .

4.4. Studium interakce kovů s FucoPolem pomocí ITC

Pro měření byl využívám přístroj TAM III. Systém TAM – izotermický titrační kalorimetr (TAM ITC) se skládá z nanokalorimetru, 1 ml odnímatelné titrační ampule s míchacím zařízením a přesné injekční stříkačky pro účinné dávkování titrantu. V nitru kalorimetru je nastavená teplota na 25,0000 $^{\circ}\text{C}$, která je stále konstantní. Před začátkem měření byla provedena kalibrace přístroje.

Před samotným vložením vzorků do kalorimetru je nutné provést jejich odplynění. Vzorky FucoPolu a jednotlivých roztoků kovů byly nadávkovány do ampulí a následně vloženy do odstředivky MiniSpin plus (Eppendorf) nastavené na 5 minut a 5000 $\text{ot} \cdot \text{min}^{-1}$. Dále byla provedena hydratace držáku měrné cely destilovanou vodou.

Pomocí automatické pipety bylo nadávkováno 750 μl zásobního roztoku FucoPol do měrné cely. Měrná cela byla připevněna ke držáku s míchadlem a zajištěna bezpečnostním zámkem a pomalu vkládána do příslušného kalorimetru. Do celého objemu skleněné trubičky byl nadávkován zásobní roztok příslušného kovu. Trubička byla vložena do čerpadla a zlatý konec byl zastrčen do držáku měrné cely. Celý držák byl opatrně vsunut dovnitř kalorimetru a zašroubován. Poté bylo připojeno otáčení. Následně byly nastaveny podmínky pro měření a po ustálení signálu byl spuštěn experiment. Všechny titrace FucoPolu se prováděly ve dvou opakováních pro každý roztok kovu. Následně byl spuštěn experiment pro titraci destilované vody roztokem kovu (blank), aby se vyloučila možná interakce samostatného FucoPolu s ultračistou destilovanou vodou.



Obrázek 6: Využívané příslušenství izotermického titračního kalorimetru TAM III. Zleva: držák měrné cely s míchadlem; měrná cela; skleněná trubička se zlatou kapilárou; čerpadlo; pohled na celou aparaturu TAM III.

4.4.1. Příprava zásobních roztoků pro měření ITC

Pro přípravu zásobního roztoku FucoPol bylo využito následujícího postupu. 0,1 g FucoPolu bylo rozpuštěno v 50 ml ultračisté destilované vody a potom byl tento roztok míchán po dobu 24 hodin na magnetickém míchadle ($250 \text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$) při laboratorní teplotě. Po 24 hodinách byl roztok doplněn ultračistou destilovanou vodou na konečný objem 50 ml. Konečná koncentrace zásobního roztoku FucoPolu byla $2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. S touto koncentrací byly provedeny veškeré experimenty ITC v rámci této bakalářské práce.

Dále byly připraveny zásobní roztoky kovů o celkové koncentraci 0,025 M v ultračisté destilované vodě. Byly připraveny zásobní roztoky 4 kovů: dusičnanu měďnatého, dusičnanu kobaltnatého, dusičnanu olovnatého, dusičnanu zinečnatého.

4.5. Studium interakce kovů s FucoPolem pomocí sorpčních experimentů

Nejdříve byly proměřeny na spektrofotometru UV/VIS Hitachi U-3900H všechny vzorky kalibračních řad v rozsahu vlnových délek 200-900 nm v křemenných jednocentimetrových kyvetách.

Zahřátím 1 hm. % roztoků agarózových gelů bez a s FucoPolem na 80°C byly získány gely, které se následně nalily do jednocentimetrových skleněných trubiček, které byly předem zváženy na předvážkách (přesnost na 3 desetinná místa). Gely se umístily na 30 minut do exsikátoru. Po ztuhnutí byly seříznuty do roviny, a i s trubičkami zváženy. Následně se vložily do 10 ml roztoku kovu o určité koncentraci (0,2 M; 0,1 M; 0,05 M; 0,01 M; 0,005 M a 0,001 M), kde byly ponechány cca 13 hodin (přes noc). Každý vzorek byl takto připraven třikrát pro oba dva připravené gely (čistý 1 hm. % agarózový gel a 1 hm. % agarózový gel s obsahem 0,2 hm. % FucoPolu).

Po vyjmutí gelů z roztoků byly vloženy do 10 ml ultračisté destilované vody. Roztoky kovů po sorpci byly proměřené na spektrofotometru UV/VIS Hitachi U-3900H v rozsahu vlnových

délek 200-900 nm v křemenných jednocentimetrových kyvetách. Následně byla porovnána spektra kalibračních řad a roztoků po absorpci.

Po několika dnech byla stejným způsobem proměřena spektra po resorpci ve vodě.

4.5.1. Příprava zásobních roztoků a gelů pro měření sorpčních experimentů

Pro samostatné sorpční experimenty byly nachystané kalibrační řady roztoků kovů o koncentracích 0,2 M; 0,1 M; 0,05 M; 0,01 M; 0,005 M a 0,001 M. Pro sorpční experiment byl použit zásobní roztok FucoPolu o koncentraci $5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Bylo připraveno 25 ml 1 hm. % roztok agarózového gelu (0,25 g agarózy + 25 ml ultračistá destilovaná voda) a 25 ml 1 hm. % roztok agarózového gelu (0,25 g agarózy + 25 ml FucoPolu).



Obrázek 7: Připravené gely pro sorpční experimenty

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Charakterizace FucoPolu

5.1.1. Elementární a termogravimetrická analýza

Výsledky elementární analýzy jsou uvedeny v Tabulce 4. Naměřené hodnoty jsou vztažené k suchému vzorku FucoPolu. Z výsledků je patrné, že nejvíce je z organických prvků ve struktuře FucoPolu zastoupený uhlík (40,04 hm. %) a kyslík (31,85 hm. %). Naopak nejméně bylo naměřeno dusíku (2,17 hm. %).

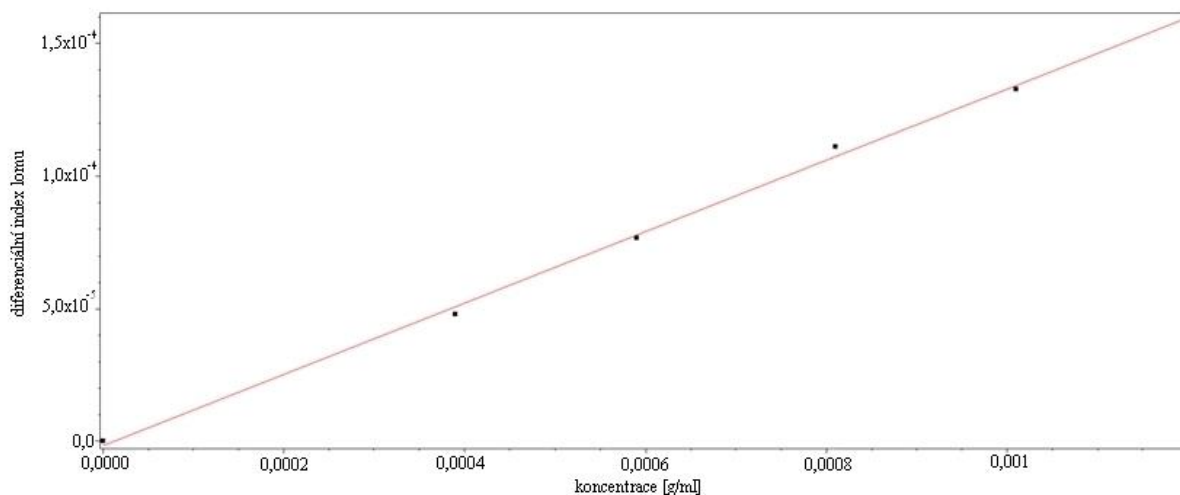
Termogravimetrickou analýzou byl stanoven celkový obsah organické hmoty a přítomnost anorganických nečistot v analyzovaném vzorku (= popel), který činil 4,83 hm. %. Dále byla také určena vlhkost, která byla 10,6 hm. %.

Tabulka 4: Výsledky elementární analýzy FucoPolu

Elementární složení [hm. %]				popel [hm. %]	vlhkost [hm. %]
C	H	N	O		
40,04	7,50	2,17	34,85	4,83	10,6

5.1.2. Určení molekulové hmotnosti

Pro stanovení molekulové hmotnosti bylo nutno stanovit inkrement indexu lomu (dn/dc). Pro jehož určení byla sestavena kalibrační řada roztoků FucoPolu, kterou můžeme vidět na Obrázku 8.



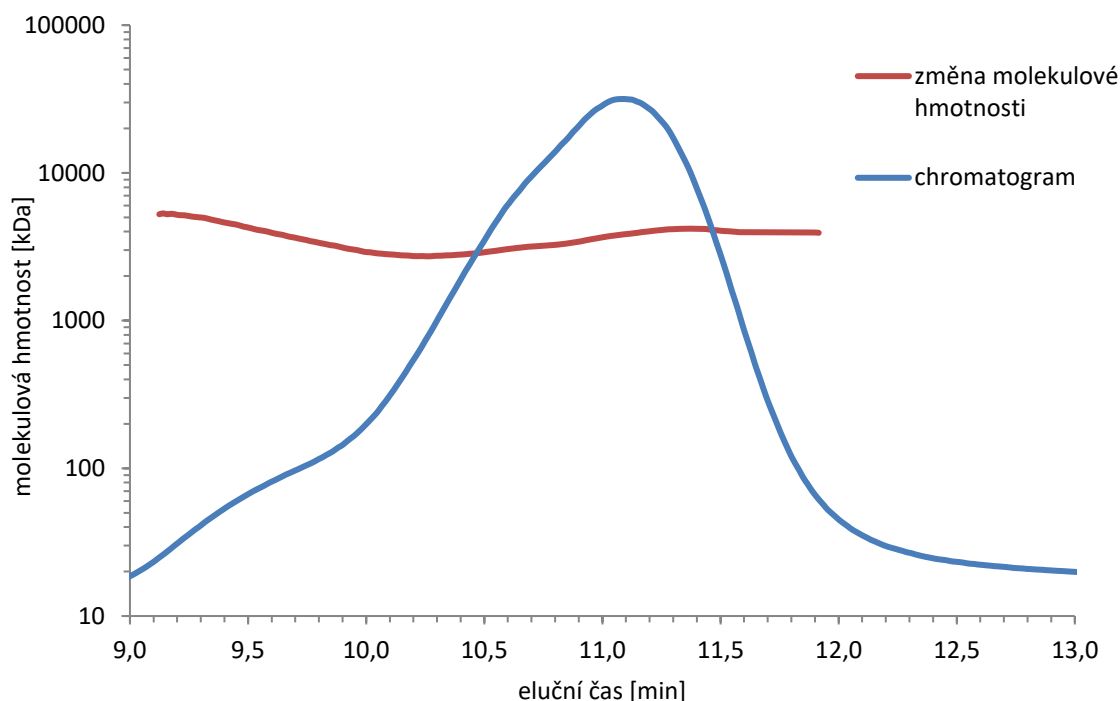
Obrázek 8: Kalibrační řada pro stanovení inkrementu indexu lomu

Dále bylo pomocí velikostně vylučovací chromatografie (SEC) s víceúhlovým rozptylem světla (MALS) a diferenciální detekcí indexu lomu (dRI) byl stanoven početní M_n a hmotnostní M_w střed, dále index polydisperzity (PDI), který prezentuje míru distribuce molekulových hmotností a je získán poměrem M_w/M_n . Také byl stanoven gyrační poloměr R_w (střední kvadratický poloměr), který udává průměrnou vzdálenost všech hmotných bodů od těžiště řetězce a charakterizuje míru velikosti molekuly. Vzorek byl podroben měření celkem pětkrát. Naměřená data byla zprůměrována a zaznamenána v přehledné tabulce (Tabulka 5) i se směrodatnými odchylkami.

Tabulka 5: Naměřená data pomocí SEC-MALLS-dRI

	Mn [kDa]	Mw [kDa]	PDI [-]	Rw [nm]	dn/dc [ml/g]
Průměr	3016	3208	1,06	115,9	0,1347
SMODCH	298	277	0,02	7,8	0,0028

Z Tabulky 5 můžeme vidět, že hmotnostní a početní střed biopolymeru si je velmi blízký. Proto se vypočtený index polydisperzity blíží jedné, což znamená, že systém je téměř uniformní (monodisperzní). Oproti tomu u průmyslově vyráběných polymerů se index polydisperzity pohybuje okolo 1,5 až 2,0, ale může dosahovat i několik desítek. Molekulová hmotnost FucoPolu byla stanovena na $3\,208 \pm 277$ kDa. Molekulová hmotnost byla porovnána s publikovanou molekulovou hmotností FucoPolu, která činí 4 190–5 800 kDa [7]. Odchylka molekulové hmotnosti mohla být způsobena částečnou časovou degradací vzorku nebo také tím, že bakterie nasyntetizovaly polymer o nižší molekulové hmotnosti. V závislosti na zdrojové biomase a podmínkách kultivace se může molekulová hmotnost lišit.



Obrázek 9: Chromatogram – závislost molekulové hmotnosti na elučním čase s vyznačenou změnou molekulové hmotnosti

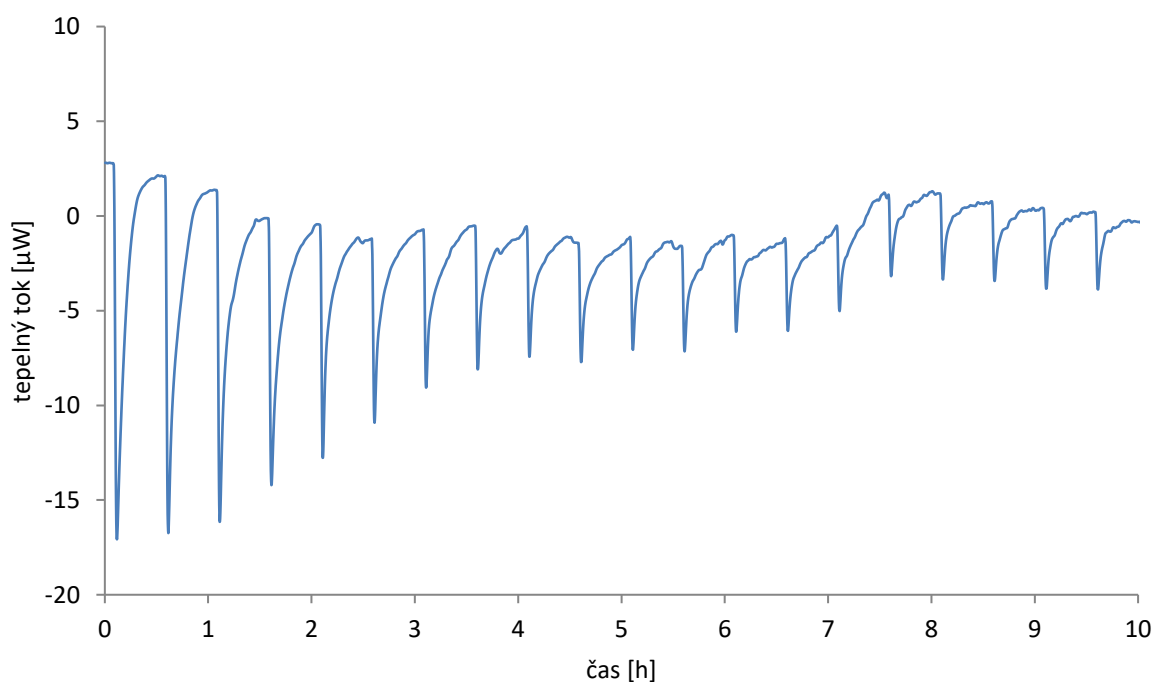
5.2. Studium interakce kovů s FucoPolem pomocí ITC

Pomocí ITC se měří teplo absorbované nebo generované při interakci molekul. Tyto tepelné změny jsou velmi malé. Roztok FucoPolu byl umístěn do měrné cely a roztok příslušného kovu (ligand), kterým byl FucoPol titrován, do skleněné trubičky. Po nastavení přístroje na požadované parametry měření byl spuštěn experiment. Když je roztok ligandu (kovu) vstřikován do roztoku biopolymeru, přístroj ITC detekuje teplo, které je uvolněno nebo absorbováno v důsledku interakce. To se provádí měřením změn výkonu potřebného k udržení izotermických podmínek. Injekce se provádějí opakovaně v malých množstvích a výsledkem jsou píky, které se zmenšují postupně s nasycením biopolymeru. Konec experimentu je indikován konstantními píky, které již představují pouze teplo zředění a nedochází zde už

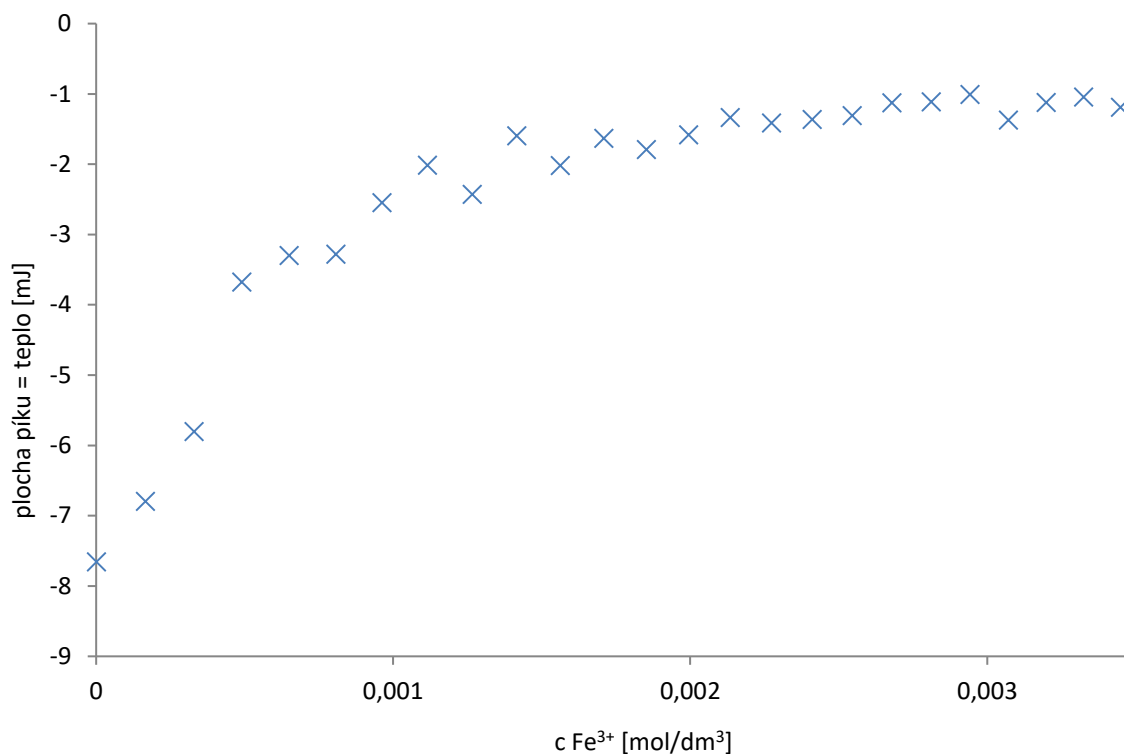
k žádným interakcím mezi roztoky (vazebná místa jsou plně vytitrována). Po dokončení titrace jsou jednotlivé píky integrovány přístrojovým softwarem. Výsledkem měření je tedy graf se surovými daty (Obrázek 10). Z výstupu měření je dále možné získat statistické informace o experimentu. Pro další zpracování byla využita plocha píku a surová data. V programu Microsoft Excel 2016 byl sestaven graf závislosti plochy píku (=uvolněného tepla) na koncentraci ligandu – soli (Obrázek 11). Je patrné, že uvolněné teplo je záporné, jedná se tedy o exotermní reakci.

Dále byla surová data exportována do programu Origin (verze 2018b), kde byla proložena Boltzmannovou křivkou, která prošla derivací (Obrázek 12) a z inflexního bodu byla určena hodnota koncentrace kovu, která odpovídala bodu ekvivalence. Z inflexního bodu a příslušného objemu soli bylo vypočítané látkové množství soli, které bylo následně vztaženo na látkové množství FucoPolu. Z hodnot maximálního a minimálního uvolněného tepla při titraci byla určena změna tepla interakce, která byla následně přepočtena na hodnotu entalpie (Tabulka 6).

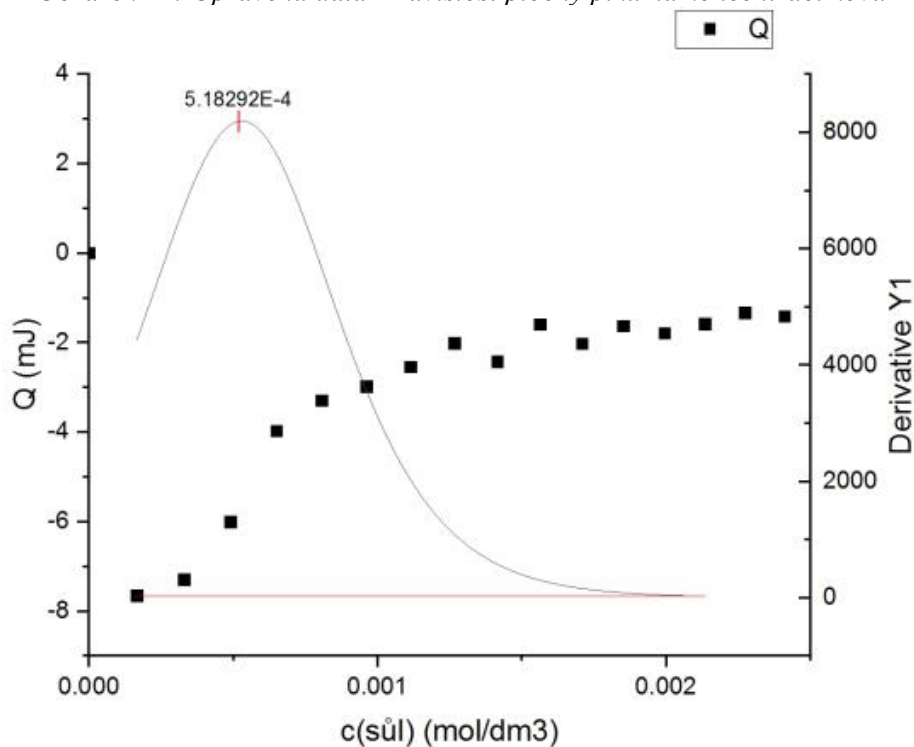
Všechny úpravy, které byly prováděny s naměřenými daty, jsou ukázány názorně na experimentu titrace FucoPolu o koncentraci $2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ dusičnanem železitým $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ o koncentraci 0,025M.



Obrázek 10: Zápis surových dat z kalorimetru – závislost tepelného toku na čase



Obrázek 11: Upravená data – závislost plochy píku na koncentraci kovu



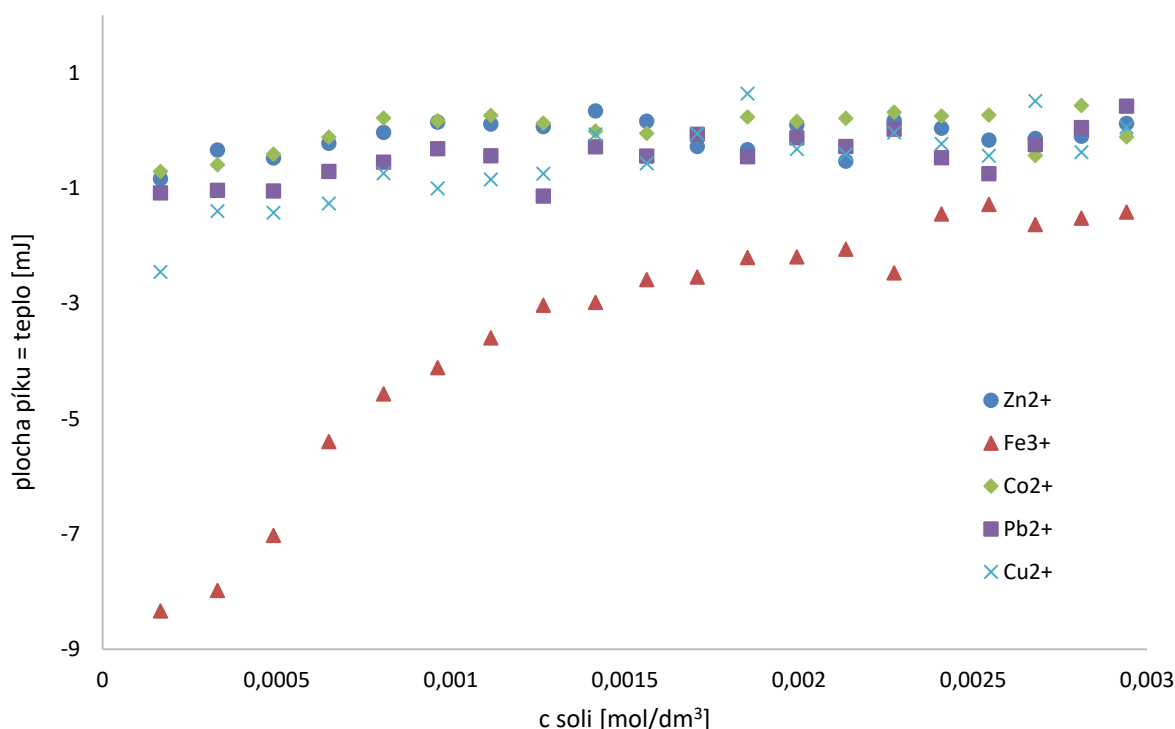
Obrázek 12: Vyhodnocená data včetně inflexního bodu pomocí programu Origin

Z Tabulky 6 je patrné, že nejsilnější interakce má roztok dusičnanu železitého, a to zejména kvůli tomu, že je železo trojvalným prvkem a tím pádem má i nejvíce vazebných míst na interakci k FucoPolem. Dále byla silná interakce pozorována u roztoků dusičnanu měďnatého. Interakce kobaltnatých iontů byla nižší než u předchozích. U zinečnatých a olovnatých iontů byla velmi nízká. Tato skutečnost byla viditelná již ze surových dat, kde u zinečnatých

a olovnatých iontů se nacházel bod ekvivalence u velmi nízkých koncentrací a tím pádem již velice brzy nedocházelo k žádným interakcím mezi těmito ionty a roztokem FucoPolu. Demonstrat si tuto skutečnost můžeme na následujícím grafu (Obrázek 13), který znázorňuje závislost množství uvolněného tepla na koncentraci soli. Z tohoto grafu je jasné patrné, jak velké interakce probíhají mezi jednotlivými roztoky kovů a FucoPolem.

Tabulka 6: Změna tepla interakce a změna entalpie pro jednotlivé roztoky solí

	Fe^{3+}	Cu^{2+}	Co^{2+}	Pb^{2+}	Zn^{2+}
dQ [J]	7,0657	1,8371	0,9200	0,8397	0,6190
dH [mJ/mol]	0,1574	0,0467	0,0108	0,0101	0,0515



Obrázek 13: Graf závislosti plochy píku (= uvolněného tepla) na koncentraci soli pro všechny roztoky kovů

5.3. Studium interakce kovů s FucoPolem pomocí sorpčních experimentů

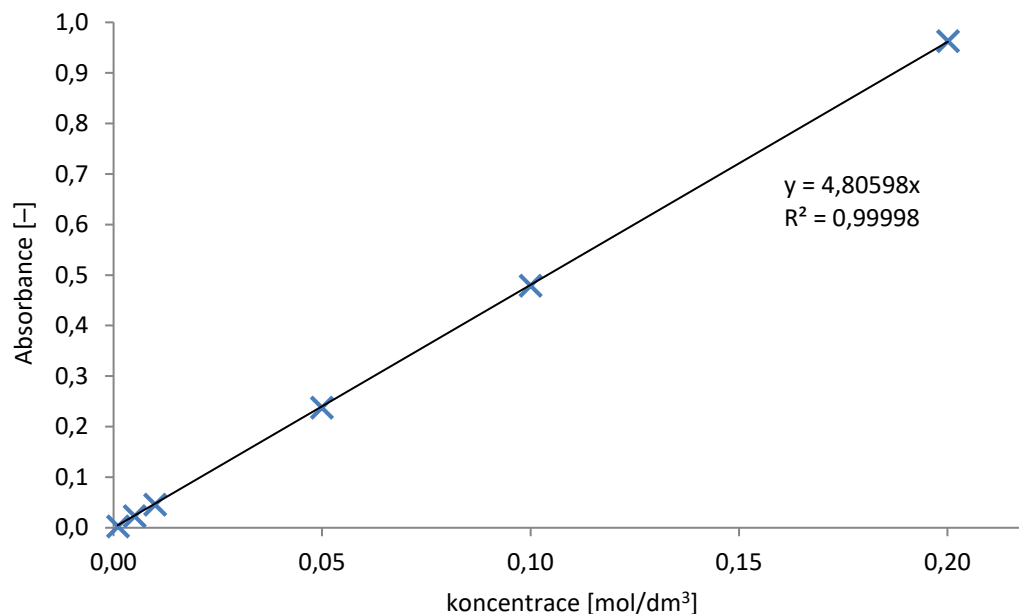
Vzhledem k výsledkům z ITC byli vybráni reprezentativní zástupci pro sorpční experimenty. Byly použity roztoky kovů, které měly největší interakci s FucoPolem – roztoky Fe^{3+} , Cu^{2+} . Dále byl vybrán roztok Co^{2+} , který reagoval s polysacharidem méně. Tito zástupci se podrobili sorpčním experimentům kvůli jejich barevnosti, která byla výhodná pro detekci změn v koncentraci pomocí UV-VIS spektroskopie.

5.3.1. Kalibrační křivky

Pro sorpční experimenty je nutné správně kvantifikovat koncentrace iontů v roztoku. Proto byly připraveny kalibrační řady kovů ve vodných prostředích, aby bylo možné monitorovat změny koncentrace v důsledku sorpce kovů na gely (Obrázek 14).

Z kalibračních křivek byly vypočteny molární absorpční koeficienty pro každý roztok kovu, které byly následně použity při výpočtech rovnovážných koncentrací po sorpcích (Tabulka 7). Největší molární absorpční koeficient byl u roztoků CuCl_2 a $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$. Naopak nejmenší byl

zjištěn u roztoků CoCl_2 a $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$. U roztoků $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ se tato hodnota může mírně lišit, jelikož bylo obtížné stanovit pík odpovídající maximální absorbanci při charakteristické vlnové délce.



Obrázek 14: Příklad získané kalibrační křivky pro roztoky $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ včetně rovnice lineární regrese a koeficientu spolehlivosti

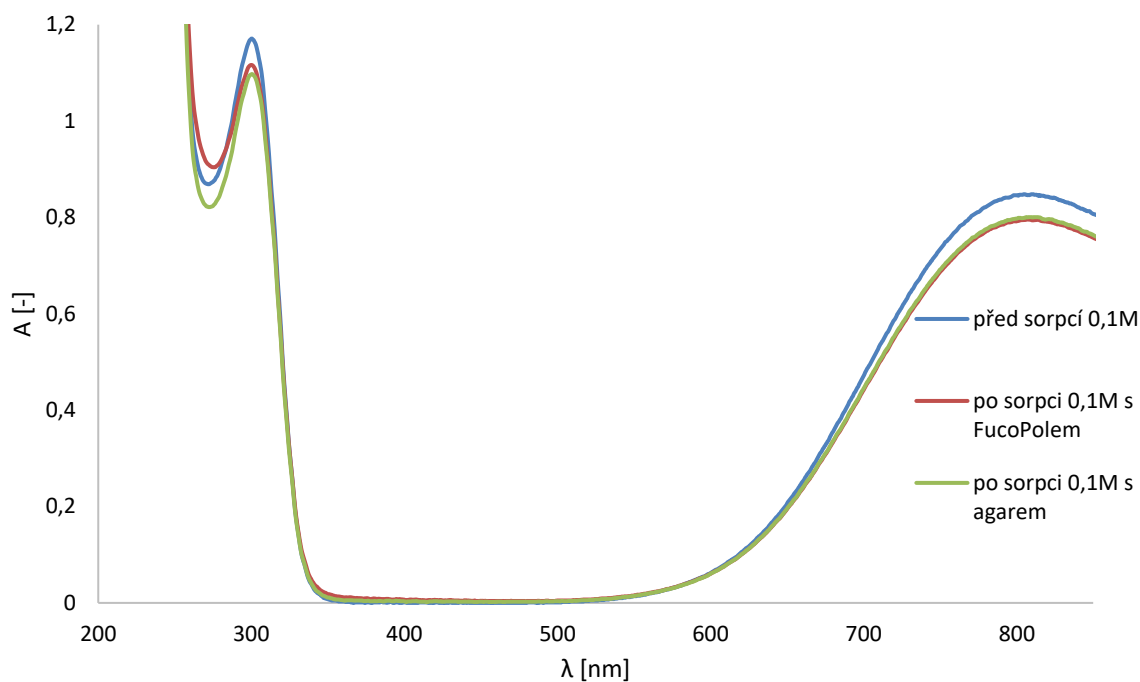
Tabulka 7: Souhrn molárních absorpčních koeficientů pro jednotlivé roztoky kovů

Roztok	Molární absorpční koeficient ϵ [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
CuCl₂	14,473
Cu(NO₃)₂	8,506
CoCl₂	4,819
Co(NO₃)₂	4,806
Fe(NO₃)₃	6,761

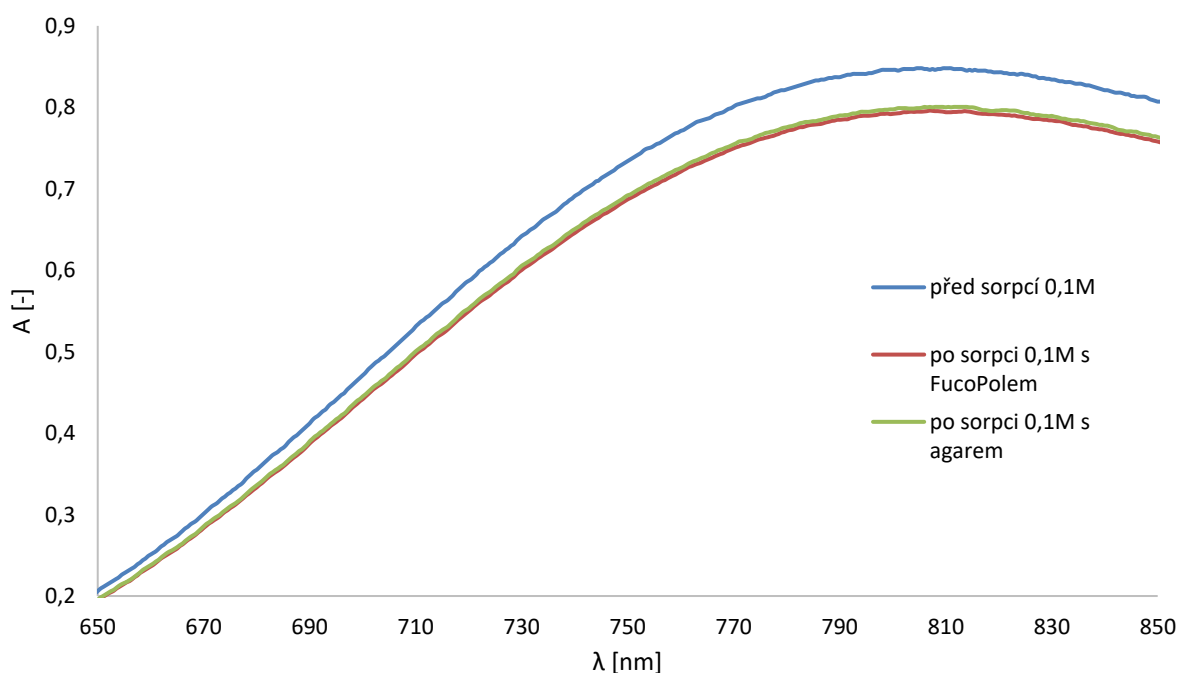
5.3.2. Sorpční experimenty

Hlavní náplní bylo studium transportu a reaktivity FucoPolu s vybranými kovy (Cu, Co, Fe) pomocí jednoduchých sorpčních experimentů, kdy byly skleněné trubičky naplněné agarózovým gelem s přídavkem FucoPolu a následně i bez přídavku FucoPolu ponořeny do sorpčního roztoku daného kovu. Po uplynutí definované doby experimentu (24 hodin), byla změřena UV-VIS spektra roztoků po sorpci a ta byla následně porovnána s UV-VIS spektry zdrojových sorpčních roztoků před započítím sorpce.

Na záznamu UV-VIS pro roztok dusičnanu měďnatého $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ pro koncentraci 0,1 M (Obrázek 15) je patrné, že došlo vlivem sorpcí ke snížení absorbance měřeného roztoku. U roztoků, kde se nacházel gel s čistou agarózou, byla pozorována větší hodnota absorbance než u roztoků, ve kterých byl gel obsahující FucoPol (Obrázek 16). Z naměřených dat můžeme říci, že gely s FucoPolem absorbovaly větší množství kovu než gely s čistou agarózou, jelikož má větší vaznost než čistá agaróza. Tato skutečnost byla dobře viditelná pro roztoky kovů o vyšších koncentracích. U nižších koncentrací byly rozdíly minimální.



Obrázek 15: Příklad naměřených UV-VIS spekter pro roztok $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 0,1 M



Obrázek 16: Výřez z UV-VIS spektra pro roztok $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 0,1 M

Kalibrační křivky byly použity na přepočet získaných záznamů z UV-VIS měření sorpcí pro koncentrace roztoku před sorpcí a po sorpci. Z těchto dat bylo možné vypočítat adsorbované množství kovu na hmotnost gelu (Tabulka 8). Z výsledků je vidět, že menší rozdíly mezi sorbovanými množstvími jsou u roztoku dusičnanu kobaltnatého, který i při měření ITC vykazoval nízkou míru interakce s FucoPolem. Pro nízké koncentrace tohoto roztoku nebylo možné stanovit adsorbovaná množství, a to nejspíše kvůli vysokému šumu přístroje, který posouval tato množství do záporných hodnot.

$$n_{sopr} = c_{před} \cdot V_{rozp} - c_{po} \cdot V_{rozp} \text{ [mmol]} \quad (1)$$

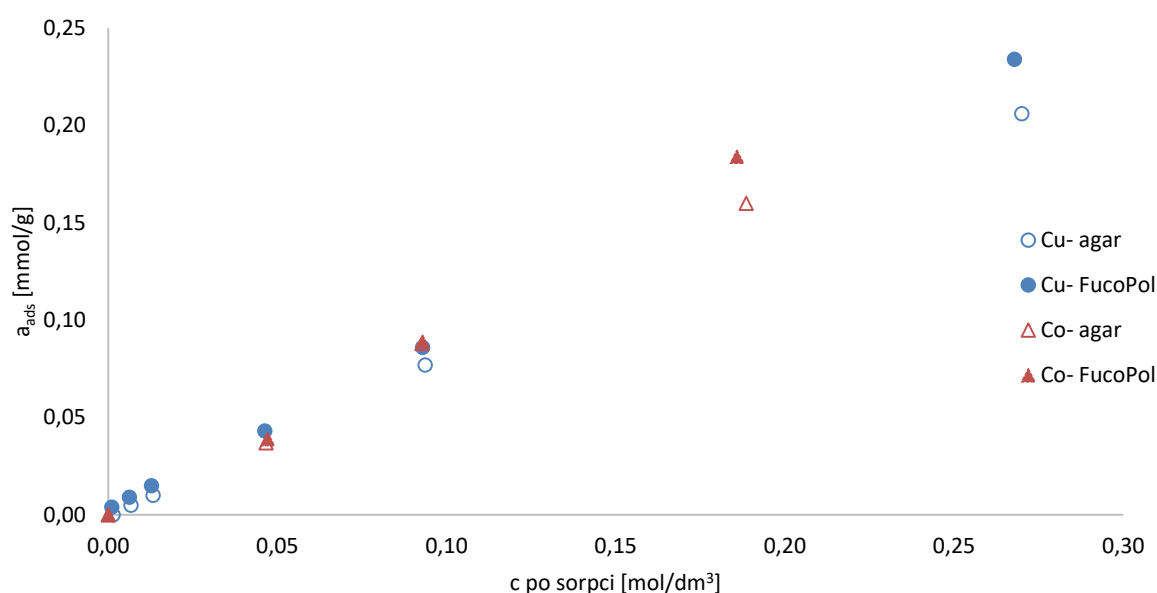
$$a_{ads} = \frac{n_{sopr}}{m_{gel}} \text{ [mmol/g]} \quad (2)$$

Tabulka 8: Adsorbovaná množství kovů na gely při různých koncentracích s odchylkami

	Cu(NO₃)₂		Co(NO₃)₂	
	a_{ads} [mmol·g⁻¹]		a_{ads} [mmol·g⁻¹]	
Koncentrace [mol·dm⁻³]	Čistý agar	Agar+ FucoPol	Čistý agar	Agar+ FucoPol
0,001	0,0000 ± 0,0000	0,0045 ± 0,0015	-	-
0,005	0,0046 ± 0,0000	0,0094 ± 0,0021	-	-
0,01	0,0096 ± 0,0010	0,0150 ± 0,0001	-	-
0,05	0,0367 ± 0,0027	0,0431 ± 0,0035	0,0369 ± 0,0027	0,0385 ± 0,0023
0,1	0,0773 ± 0,0045	0,0857 ± 0,0012	0,0876 ± 0,0022	0,0885 ± 0,0024
0,2	0,21 06± 0,0098	0,2337 ± 0,0148	0,1601 ± 0,0403	0,1835 ± 0,0006

Roztoky Fe(NO₃)₃ nebyly stálé. Docházelo k oxidačně-redukčním dějům, které byly pozorovány zakalením některých z roztoků po dni stání. Po vložení gelů do roztoků se opět změnil jejich charakter a výsledná UV-VIS spektra nemohla být optimálně hodnocena a tím pádem nebylo možné stanovit adsorbovaná množství v jednotlivých gelech. Vzhledem k posunu UV-VIS spekter a posunu charakteristické vlnové délky by bylo nutné stanovit obsah železa jako celkový obsah v extraktu nebo jako zbytkový obsah v gelu jinými metodami jako například atomovou absorpční spektroskopií (AAS) nebo optickou emisní spektroskopií s iontově vázaným plazmatem (ICP-OES). Tyto metody charakterizaci jsou již nad rámcem této bakalářské práce, nicméně mohou být námětem pro práce navazující.

Ze závislosti adsorbovaného množství na příslušných rovnovážných koncentracích byl sestrojen graf (Obrázek 17), který disponuje téměř přímkovým trendem. Je zde jasné vidět, že adsorbovaná množství jsou větší u roztoků, ve kterých se nacházel gel s FucoPolem.



Obrázek 17: Závislost adsorbovaného množství na příslušných rovnovážných koncentracích

5.3.3. Desorpce

Po sorpci byly gely vloženy do ultračisté destilované vody, kde byly ponechány několik dní. Byla opět změřena UV-VIS spektra jednotlivých roztoků a porovnána mezi sebou. Bylo vypočteno resorbované množství, které se uvolnilo z gelu zpět do roztoku. Roztoky $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ nebyly zahrnuty do tabulky opět z důvodu fázových změn systému a tudíž neměly dobrou vypovídací hodnotu. Uprostřed gelů byla pozorována zbarvená vrstva kovu, která byla ohraničena průhledným zbytkem gelu (Obrázek 18). Takto se chovaly pouze gely s obsahem $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$. Ostatní gely byly vždy stejně zabarvené v celém svém objemu jak po sorpci tak i po resorpci (Obrázek 19).



Obrázek 18: Gely s obsahem $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ po resorpci ve vodě

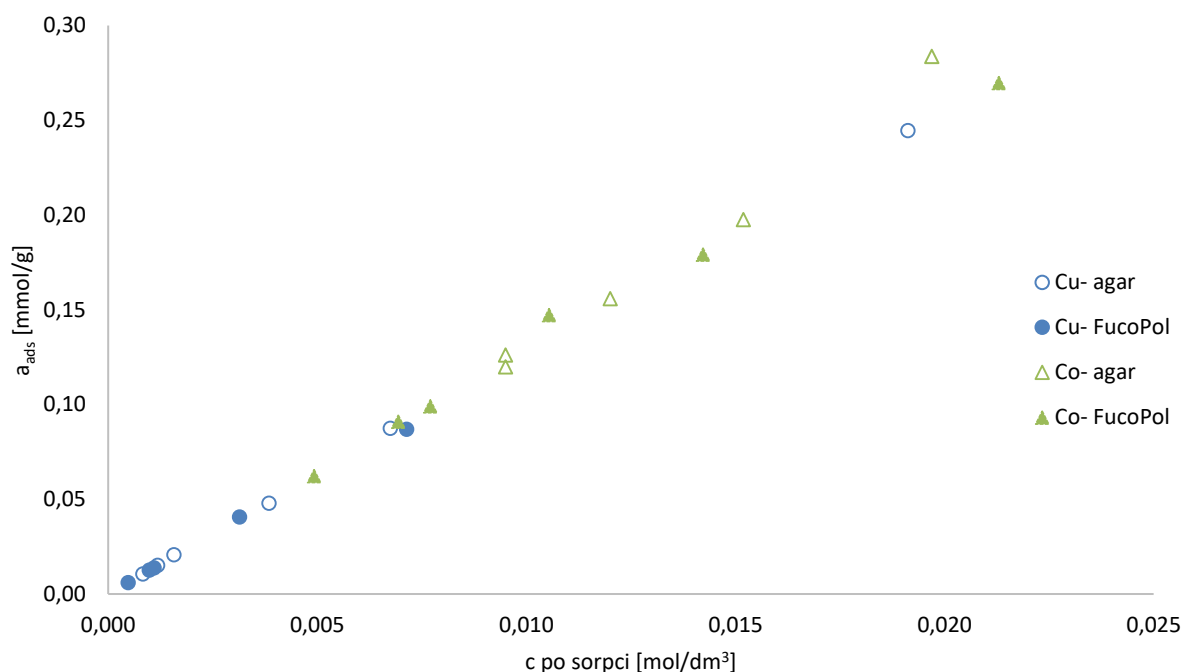


Obrázek 19: Gely s obsahem $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ po sorpci ve vodě

Předpoklad byl takový, že gel s FucoPolem bude méně ochotně uvolňovat adsorbovaný kov zpět do roztoku. Tato hypotéza byla potvrzena a následně byly porovnány hodnoty resorbovaných množství v závislosti na použitém kovu (Obrázek 20). Jak je vidět z výsledků, méně se do roztoku uvolňoval dusičnan měďnatý, který měl indikován větší interakce již v předchozích experimentech. U roztoku $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ byl z grafu vyloučen poslední bod, jelikož zde byla velká skoková změna, která ovlivnila průběh křivky. Můžeme opět vidět, že závislost resorbovaného množství na rovnovážných koncentracích je opět téměř přímková závislost. Oproti adsorpci, kde byly vidět rozdíly mezi čistými gely a gely s obsahem FucoPolu, jsou u desorpce množství uvolněného kovu zpět do roztoku téměř stejná. To se dá vysvětlit tím, že v gelech je většina kovu nadifundovaná jen v důsledku koncentračního gradientu mezi roztokem a gelem a pouze část adsorbovaného kovu je vázána interakcí na FucoPol. Po vložení gelů do vody se uvolnila pouze volná frakce a vázané frakce v gelu zůstávaly. Tím pádem jsou resorbovaná množství prakticky stejná nebo u některých gelů s obsahem FucoPolu mírně vyšší.

Tabulka 9: Resorbovaná množství kovů na gely při různých koncentracích

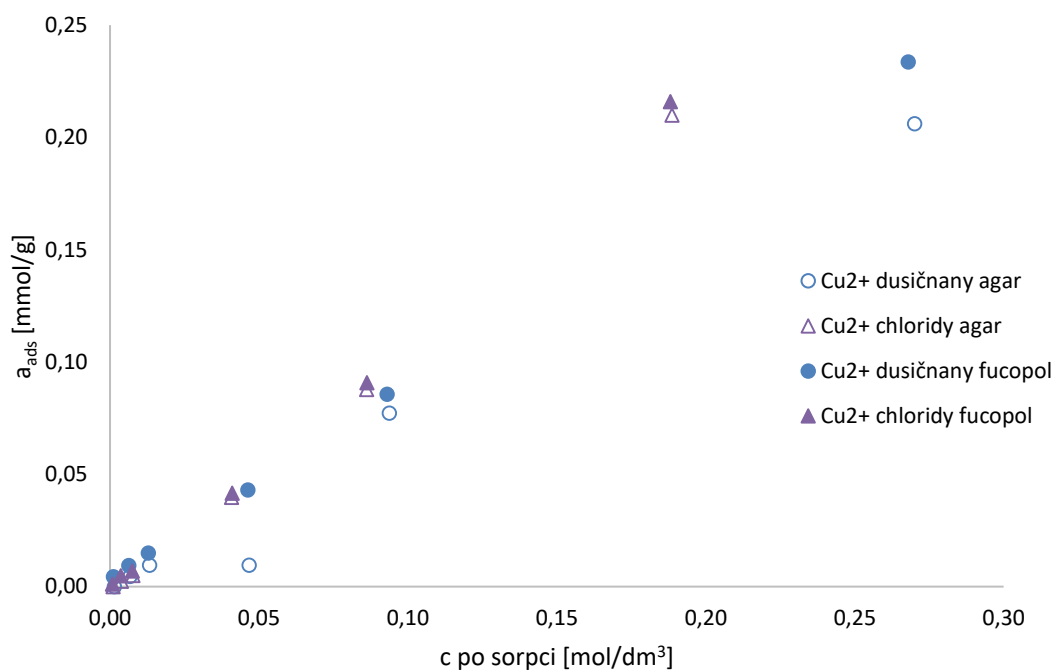
	Cu(NO₃)₂		Co(NO₃)₂	
	a_{res} [mmol·g⁻¹]		a_{res} [mmol·g⁻¹]	
Koncentrace [mol·dm⁻³]	Čistý agar	Agar+ FucoPol	Čistý agar	Agar+ FucoPol
0,001	0,0106 ± 0,000	0,0059 ± 0,0014	0,1799 ± 0,0014	0,0622 ± 0,0022
0,005	0,0206 ± 0,0000	0,0138 ± 0,0048	0,1199 ± 0,0024	0,0910 ± 0,0034
0,01	0,0151 ± 0,0018	0,0125 ± 0,0009	0,1261 ± 0,0115	0,0991 ± 0,0035
0,05	0,0479 ± 0,0054	0,0406 ± 0,0018	0,1559 ± 0,0046	0,1827 ± 0,0165
0,1	0,0875 ± 0,0017	0,0869 ± 0,0017	0,1975 ± 0,0036	0,1792 ± 0,0025
0,2	0,2444 ± 0,0025	0,2439 ± 0,0017	0,2836 ± 0,0052	0,2696 ± 0,0042



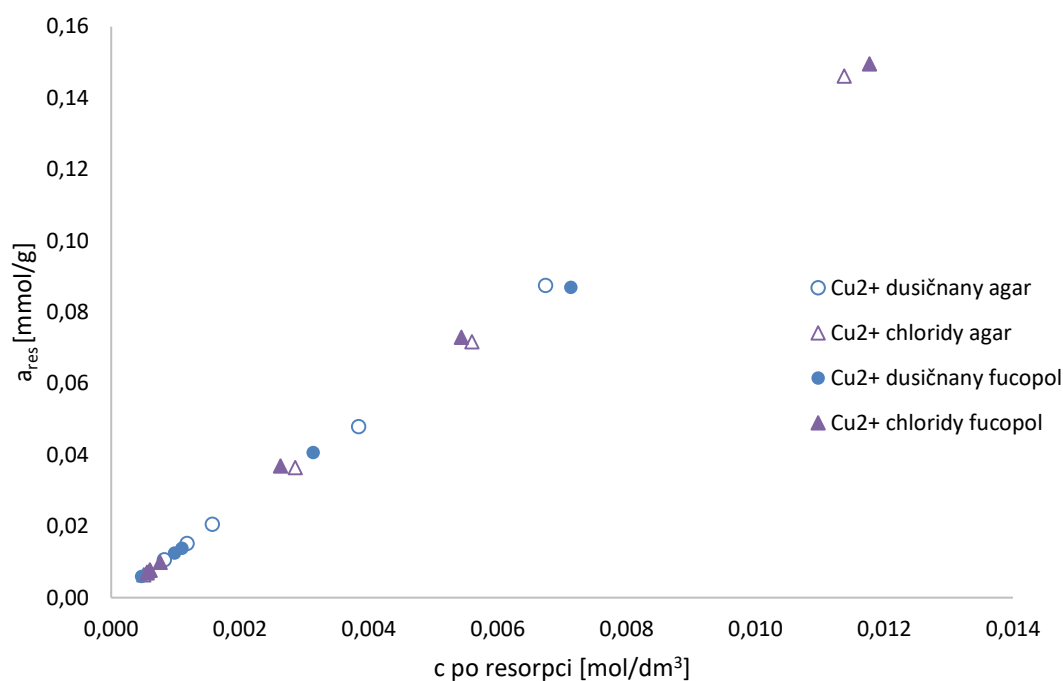
Obrázek 20: Závislost resorbovaného množství na příslušných rovnovážných koncentracích

5.3.4. Vliv aniontu

Pro studium vlivu aniontů byly provedeny také experimenty pro roztoky chloridů – měďnatý a olovnatý. Ze získaných dat bylo zjištěno, že pro Cu²⁺ ionty je schopnost adsorpce u gelů ponořených do roztoků chloridů a dusičnanů při nízkých koncentracích stejná. Při vyšších koncentracích je adsorbované množství vyšší u chloridů. Změna nastává u nejkonzentrovanejších roztoků, kde opět převládá schopnost adsorpce dusičnanů (Obrázek 21). U resorpce je resorbované množství větší u roztoků dusičnanů (Obrázek 22). U roztoku Cu(NO₃)₂ byl z grafu vyloučen poslední bod, jelikož zde byla velká skoková změna, která ovlivnila průběh křivky.

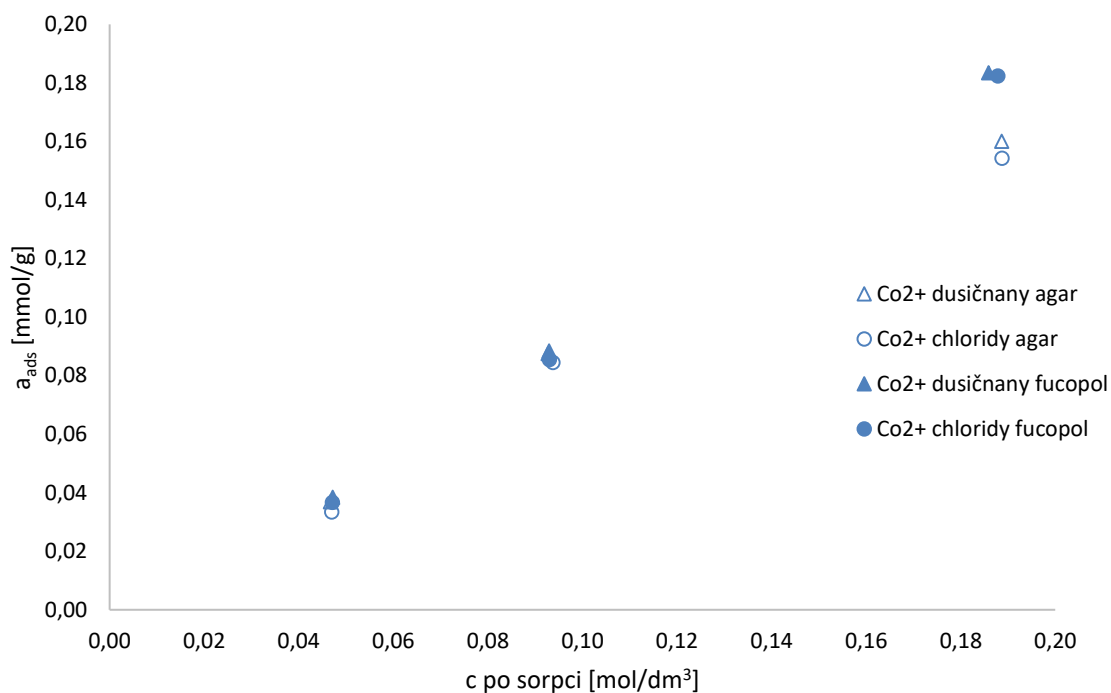


Obrázek 21: Izoterma pro roztoky Cu^{2+} pro dusičnany a chloridy po sorpci

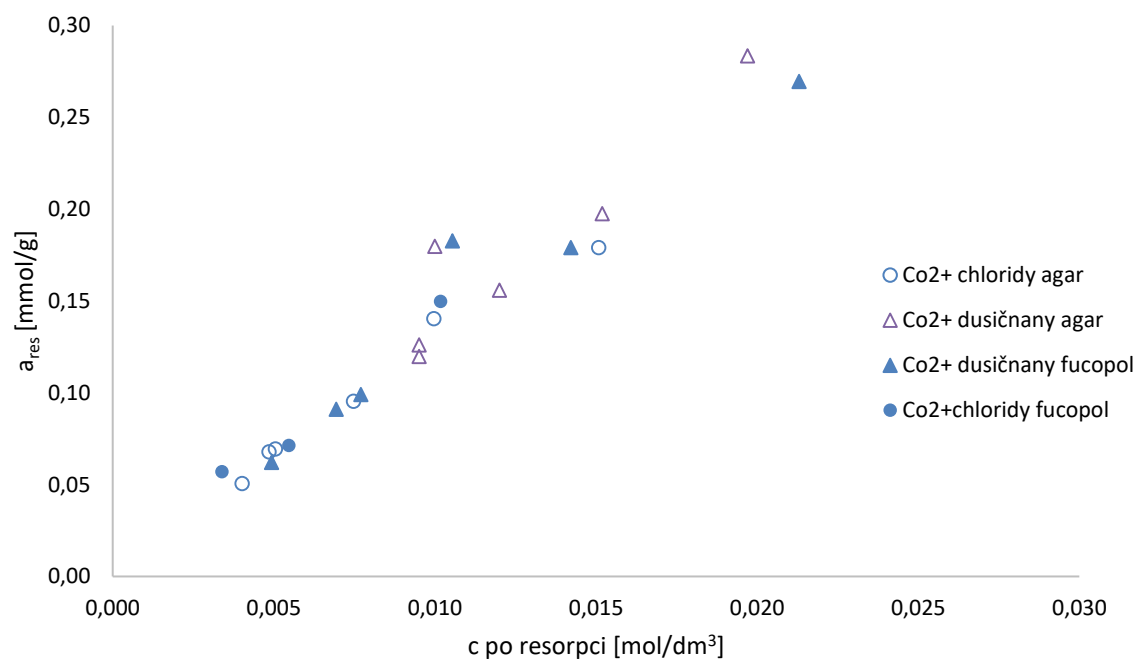


Obrázek 22: Izoterma pro roztoky Cu^{2+} pro dusičnany a chloridy po resorpci

Pro roztoky Co^{2+} je po sorpci adsorbované množství u dusičnanů a chloridů prakticky stejné (Obrázek 23). Při zpracování izotermy pro resorpci bylo nutné vyloučit ze závislosti data o nejvyšších koncentracích pro roztoky chloridů pro gely s FucoPolem, kde docházelo k větší experimentální odchylce. Nicméně, z grafu je vidět, že resorbovaná množství jsou větší zejména u vyšších koncentrací dusičnanů (Obrázek 24).



Obrázek 23: Izoterma pro roztoky Co^{2+} pro dusičnany a chloridy po sorpci



Obrázek 24: Izoterma pro roztoky Co^{2+} pro dusičnany a chloridy po resorpci

Z těchto dat vyplývá, že vliv chloridů mírně ovlivňuje adsorpci u měďnatých iontů, u kobaltnatých téměř vůbec. Při resorpci chloridy více zadržují a neresorbují tak, jako dusičnany. U dusičnanů je schopnost resorpce výrazně vyšší. Tato skutečnost může být ovlivněna změnou pH působením aniontu v gelu, v závislosti na pH se poté může měnit i charakter gelu.

6. ZÁVĚR

Bakteriální polysacharidy jsou v dnešní době velmi diskutované téma. Dají se využívat v chemickém, potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Široký rozsah jejich využitelnosti je kvůli velké rozmanitosti strukturních a funkčních vlastností. Dnes jsou nejznámější exopolysacharidy xanthan, dextran, gellan a kurdlan a jsou také nejvíce průmyslově využívány.

Velice zajímavým polysacharidem je nově objevený FucoPol, který je syntetizován bakteriemi *Enterobacter A47*. V této bakalářské práci jsem se zabývala právě tímto biopolymerem. Kvůli přítomnosti acylových skupin by měl FucoPol reagovat s kladně nabitými molekulami jako třeba roztoky kovů. Interakce s vybranými kovy byly studovány pomocí sorpčních experimentů a titrační kalorimetrie. Cílem práce bylo zjistit, zda FucoPol podporuje reakci s různými kovy a jak moc silně se vážou na jeho vnitřní strukturu. Pomocí ITC bylo zjištěno, že největší interakce byla mezi FucoPolem a ionty Fe^{3+} v roztoku dusičnanu, nejspíše kvůli nejvyšší vaznosti kovu. Dále byly pozorovány interakce s dalšími roztoky dusičnanů – měďnatým, kobaltnatým, zinečnatým, olovnatým. Silné interakce měl také roztok dusičnanu měďnatého, u roztoků dusičnanu kobaltnatého, zinečnatého a olovnatého byly zjištěny nejmenší interakce. Sorpční experimenty byly prováděny pro roztoky dusičnanů (železitý, měďnatý, kobaltnatý) a chloridů (měďnatý, kobaltnatý) uvnitř gelu. U roztoku dusičnanu železitého ovšem došlo ke změnám v systému, které byly způsobeny oxidačně-redukčními ději. Tato změna ovlivnila průběh měření a výsledky z UV-VIS měření nemohly být kvalitativně interpretovány. U sorpčních experimentů měl nejvyšší schopnost vazby na FucoPol dusičnan měďnatý a chlorid měďnatý. Součástí práce bylo rovněž posouzení vlivu aniontů použitých kationtů kovů, které mohly vést ke změně pH gelu. Sorpce kovu na gel byla u dusičnanů a chloridů srovnatelná, ovšem u chloridů poté nedocházelo k tak velké resorpci do vody jako u dusičnanů. Všechny výsledky byly porovnány oproti čistým gelům a bylo zjištěno, že gely s obsahem FucoPolu mají větší schopnost adsorpce a o něco menší schopnost resorpce než čisté gely. FucoPol je tedy schopen vázat na sebe kovy. Část adsorbovaného kovu je vázána interakcí na FucoPol a při resorpci se uvolňuje pouze volná frakce a vázané frakce v gelu zůstávají. Tato schopnost by se dala využívat průmyslově v mnoha oblastech.

FucoPol může být využíván v potravinářském průmyslu, kde by mohl sloužit jako hydrofilní vrstva obalových fólií. Díky adhezivním vlastnostem by mohl být také využíván jako přírodní lepidlo. Velkou výhodou tohoto biopolymeru je také to, že je získáván z přírodních zdrojů, a tudíž není pro životní prostředí toxický a je biologicky odbouratelný na rozdíl od syntetických polymerů.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] SCHAECHTER, Moselio. *Encyclopedia of microbiology*. 3rd edition. UK: Elsevier, 2009. ISBN 978-012-3739-445.
- [2] AHMAD, Nurul Hawa, Shuhaimi MUSTAFA a Yaakob B. CHE MAN. Microbial Polysaccharides and Their Modification Approaches: A Review. *International Journal of Food Properties* [online]. 2014, 18(2), [cit. 2018-03-16]. DOI: 10.1080/10942912.2012.693561. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10942912.2012.693561>
- [3] ÖNER, Ebru Toksoy. Microbial Production of Extracellular Polysaccharides from Biomass. *Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries* [online]. Springer Berlin Heidelberg, 2013, 35-36 [cit. 2018-03-16]. Green Energy and Technology. DOI: 10.1007/978-3-642-32735-3_2. ISBN 978-3-642-32734-6. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/281063461_Microbial_Production_of_Extracellular_Polysaccharides_from_Biomass_Sources
- [4] DONOT, F., A. FONTANA, J.C. BACCOU a S. SCHORR-GALINDO. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2012, 87(2), 951-962 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.08.083. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861711007673>
- [5] MADHURI, K, a K. PRABHAKAR. Microbial Exopolysaccharides: Biosynthesis and Potential Applications. *Oriental Journal of Chemistry* [online]. 2014, 30(3), 1401-1410 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.13005/ojc/300362. Dostupné z: <http://www.orientjchem.org/vol30no3/microbial-exopolysaccharides-biosynthesis-and-potential-applications/>
- [6] FREITAS, Filomena, Vitor D. ALVES a Maria A.M. REIS. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology* [online]. 2011, 29(8), 388-398 [cit. 2018-03-23]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.03.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779911000552>
- [7] FERREIRA, Ana R.V., Cristiana A.V. TORRES, Filomena FREITAS, Maria A.M. REIS, Vítor D. ALVES a Isabel M. COELHO. Biodegradable films produced from the bacterial polysaccharide FucoPol. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2014, 71, 111-116 [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.04.022. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813014002499>
- [8] DHADGE, V. L., P. I. MORGADO, F. FREITAS, M. A. REIS, A. AZEVEDO, R. AIRES-BARROS a A. C. A. ROQUE. An extracellular polymer at the interface of magnetic bioseparations. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 2014, 11 [cit. 2018-03-17]. DOI: 10.1098/rsif.2014.0743. Dostupné z: <http://rsif.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsif.2014.0743>
- [9] BENEŠOVÁ, Eva, Michaela MARKOVÁ, Petra LIPOVOVÁ a Blanka KRÁLOVÁ. Fukosidasy a oligosacharidy obsahující fukosu. *Chemické listy* [online]. 2005, 99(5),

- 324-329 [cit. 2018-03-17]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_05_324-329.pdf
- [10] ANTUNES, Sílvia, Filomena FREITAS, Chantal SEVRIN, Christian GRANDFILS a Maria A.M. REIS. Production of FucoPol by Enterobacter A47 using waste tomato paste by-product as sole carbon source. *Bioresource Technology* [online]. 2017, 227, 66-73 [cit. 2019-01-23]. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.12.018. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852416316698>
- [11] CONCÓRDIO-REIS, Patrícia, João R. PEREIRA, Cristiana A.V. TORRES, Chantal SEVRIN, Christian GRANDFILS a Filomena FREITAS. Effect of mono-and dipotassium phosphate concentration on extracellular polysaccharide production by the bacterium Enterobacter A47. *Process Biochemistry* [online]. 2018, 75, 16-2 [cit. 2019-01-24]. DOI: 10.1016/j.procbio.2018.09.001. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359511318305889>
- [12] ANTUNES, Sílvia, Filomena FREITAS, Vítor D. ALVES, Christian GRANDFILS a Maria A.M. REIS. Conversion of cheese whey into a fucose-and glucuronic acid-rich extracellular polysaccharide by Enterobacter A47. *Journal of Biotechnology* [online]. 2015, 210, 1-7 [cit. 2019-05-20]. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.05.013. ISSN 01681656. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165615002448>
- [13] FERREIRA, Ana R.V., Janne HAAPANEN, Jyrki M. MÄKELÄ, Jon E. BRATVOLD, Ola NILSEN, Mikko TUOMINEN, Vítor D. ALVES a Isabel M. COELHO. Comparison of different coating techniques on the properties of FucoPol films. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2017, 103, 268-274 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.021. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016325132>
- [14] ARAÚJO, Diana, Vítor D. ALVES, Joana CAMPOS, Isabel COELHO, Chantal SEVRIN, Christian GRANDFILS, Filomena FREITAS a Maria A.M. REIS. Assessment of the adhesive properties of the bacterial polysaccharide FucoPol. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, 92, 383-389 [cit. 2018-03-17]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.07.035. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016308224>
- [15] NAVARD, Patrick. *The European polysaccharide network of excellence (EPNOE): research initiatives and results*. New York: Springer, 2012. ISBN 978-3-7091-0421-7.
- [16] MARKOVIĆ, G., M. MARINOVIĆ-CINCOVIĆ, V. JOVANOVIĆ, S. SAMARŽIJA-JOVANOVIĆ a J. BUDINSKI-SIMENDIĆ. Polymer characterization (II). *Polymer science: research advances, practical applications and educational aspects* [online]. Formatex Research Center S.L., 2016, s. 397-403 [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/51c9/edc5904ad84808ad298f1e882eb2f9dfef1d.pdf>
- [17] MOHAN, Sneha, Oluwatobi S. OLUWAFEMI, Nandakumar KALARIKKAL, Sabu THOMAS a Sandile P. SONGCA. Biopolymers – Application in Nanoscience and Nanotechnology. *Recent Advances in Biopolymers* [online]. InTech, 2016, 2016-03-09 [cit. 2019-04-21]. DOI: 10.5772/62225. ISBN 978-953-51-4613-1. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-biopolymers/biopolymers-application-in-nanoscience-and-nanotechnology>

- [18] ANDHARE, Prasad, Kishor CHAUHAN, Margi DAVE a Hilor PATHAK. Microbial Exopolysaccharides: Advances in Applications and Future Prospects. *Biotechnology Volume 3: Microbial Biotechnology* [online]. Studium Press, 2014 [cit. 2019-04-21]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/280082580_Microbial_Exopolysaccharides_Advances_in_Applications_and_Future_Prospects
- [19] KHAMLUE R., A. OUNAROON, S. NUTTAWUT (2012). *Purification and characterization of polysaccharides extracted from Tremella fuciformis and Auricularia auricula* [online]. In: e-proceeding 1st Mae Fah Luang University International Conference 2012, Thailand [cit. 2018-03-28]. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/6ff5/da6381408d976bcc981cdae2158660040991.pdf>
- [20] VILAPLANA, Francisco a Robert G. GILBERT. Characterization of branched polysaccharides using multiple-detection size separation techniques. *Journal of Separation Science* [online]. 2010, 33(22), 3537-3554 [cit. 2018-04-01]. DOI: 10.1002/jssc.201000525. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201000525>
- [21] WANG, Chunhua, Dongmei LIN, Quan CHEN, Shuqian LIN, Songsheng SHI a Chunmei CHEN. Polysaccharide peptide isolated from grass-cultured Ganoderma lucidum induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects in the human U251 glioma cell line. *Oncology Letters* [online]. 2018 [cit. 2018-04-05]. DOI: 10.3892/ol.2018.7823. Dostupné z: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.7823>
- [22] WILSON, Ian D. a C. F. POOLE. *Handbook of methods and instrumentation in separation science*. Burlington, MA: Elsevier/Academic Press, 2009. ISBN 978-012-3750-952.
- [23] CORRADINI, Claudio, Antonella CAVAZZA a Chiara BIGNARDI. High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Electrochemical Detection as a Powerful Tool to Evaluate Carbohydrates of Food Interest: Principles and Applications. *International Journal of Carbohydrate Chemistry* [online]. 2012, 2012, 1-13 [cit. 2018-04-01]. DOI: 10.1155/2012/487564. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/archive/2012/487564/>
- [24] WANG, Hsueh-Ting, Li-Chan YANG, Hui-Ching YU, Miaw-Ling CHEN, Huei-Ju WANG a Ting-Jang LU. Characteristics of fucose-containing polysaccharides from submerged fermentation of Agaricus blazei Murill. *Journal of Food and Drug Analysis* [online]. 2018, 26(2), 678-687 [cit. 2018-04-15]. DOI: 10.1016/j.jfda.2017.07.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1021949817301436>
- [25] KOBERA, Libor, Martina URBANOVÁ a Jiří BRUS. Více-kvantová NMR spektroskopie pevného stavu: způsob, jak nahlédnout do struktury anorganických materiálů. *Chemické listy* [online]. 2012, 106(9), 802-808 [cit. 2018-04-19]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_09_802-808.pdf
- [26] BARROS, Francisco C.N., Draulio C. DA SILVA, Venícios G. SOMBRA, Jeanny S. MACIEL, Judith P.A. FEITOSA, Ana L.P. FREITAS a Regina C.M. DE PAULA. Structural characterization of polysaccharide obtained from red seaweed Gracilaria caudata (J Agardh). *Carbohydrate Polymers* [online]. 2013, 92(1), 598-603

- [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.09.009. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861712009174>
- [27] HUSSAIN, Syed Zameer a Khushnuma MAQBOOL. GC-MS: Principle, Technique and its application in Food Science. *International Journal of Current Science* [online]. 2014, 13(3), 116-126 [cit. 2018-04-21]. ISSN 2250-1770. Dostupné z:
<http://www.currentsciencejournal.info/issuespdf/Syed%2014.pdf>
- [28] BUMBRAH, Gurvinder Singh a Rakesh Mohan SHARMA. Raman spectroscopy – Basic principle, instrumentation and selected applications for the characterization of drugs of abuse. *Egyptian Journal of Forensic Sciences* [online]. 2016, 6(3), 209-21 [cit. 2019-02-07]. DOI: 10.1016/j.ejfs.2015.06.001. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090536X15000477>
- [29] MANEK, Rahul V., Philip F. BUILDERS, William M. KOLLING, Martins EMEJE a Olobayo O. KUNLE. Physicochemical and Binder Properties of Starch Obtained from *Cyperus esculentus*. *AAPS PharmSciTech* [online]. 2012, 13(2), 379-388 [cit. 2019-05-20]. DOI: 10.1208/s12249-012-9761-z. ISSN 1530-9932. Dostupné z:
<http://link.springer.com/10.1208/s12249-012-9761-z>
- [30] SEILEROVÁ, Lenka, Hana BRUSOVÁ, Bohumil KRATOCHVÍL a Lukáš KREJČÍK. Využití metod termické analýzy ve výzkumu a vývoji léčiv. *Chemické listy*. 2012, 106, 890-895 [cit. 2019-02-18].
Dostupné z: http://www.w.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_10_890-895.pdf
- [31] DE VICENTE, Juan. *Rheology* [online]. InTech, 2012 [cit. 2019-05-20]. ISBN 978-953-51-0187-1. Dostupné z:
<http://www.issp.ac.ru/ebooks/books/open/Rheology.pdf>
- [32] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0579-X.
- [33] BARCELOS, Mayara C. S., Kele A. C. VESPERMANN, Franciele M. PELISSARI a Gustavo MOLINA. Current status of biotechnological production and applications of microbial exopolysaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2019, 1-21 [cit. 2019-05-20]. DOI: 10.1080/10408398.2019.1575791. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2019.1575791>

8. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

8.1. Použité symboly

Symbol	Význam symbolu	Jednotka
c	koncentrace látky	$\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$
a_{ads}	adsorbované množství	$\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$
a_{res}	resorbované množství	$\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$
ε	molární absorpční koeficient	$\text{dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
n	látkové množství	mol
V	objem	m^3
m	hmotnost	kg
M_n	střední číselná molekulová hmotnost	Da
M_w	střední hmotnostní molekulová hmotnost	Da
A	absorbance	-
R_w	gyrační poloměr	m
Q	teplo	J
H	reakční entalpie	$\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$

8.2. Použité zkratky

EPS	exopolysacharidy
UDP	uridindifosfát
NDP	nukleosidifosfát
GDP	guanosindifosfát
CoA	koenzym A
LB	Luria Bertani
LDPE	polyetylen s nízkou hustotou
UV	ultrafialová oblast spektra elektromagnetického záření
VIS	viditelná oblast spektra elektromagnetického záření
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
NMR	nukleární magnetická spektroskopie
EPR	elektronová paramagnetická rezonance
MS	hmotnostní spektrometrie
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
SEC-MALLS	rozměrově vylučovací chromatografie s víceúhlovým rozptylem světla
GC	plynová chromatografie
CE	kapilární elektroforéza
HPAEC	vysokoučinná aniontová chromatografie
XRD	rentgenová difrakce
HDC	hydrodynamická chromatografie
PED	pulzní elektrochemická detekce
PAD	pulzní amperometrická detekce

DSS	4,4-dimethyl-4-silapentan-1-sulfonová kyselina
TG	termogravimetrie
DSC	diferenciální skenovací kalorimetrie
DTA	diferenciální termická analýza
TD	termodilatometrie
TMA	termomechanická analýza
DPA	diferenční tlaková analýza
HSM	termomikroskopie
EDTA	kyselina entylendiamintetraoctová
PAHs	polycyklické aromatické uhlovodíky
ITC	izotermická titrační kalorimetrie
PDI	index polydisperzity
R _w	gyrační poloměr
dn/dc	inkrement indexu lomu
AAS	atomová absorpční spektroskopie
ICP-OES	optická emisní spektroskopie s iontově vázaným plazmatem